

**Neue Auswertemethoden  
in der quantitativen Dünnschichtchromatographie**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**vorgelegt von  
Günter Herold  
aus Frankfurt/Oder**

**Marburg 1975**

**Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg**



**Neue Auswertemethoden  
in der quantitativen Dünnschichtchromatographie**

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



vorgelegt von

**Günter Herold**

**aus Frankfurt/Oder**

**Marburg 1975**

**Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg**



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am :

30.5.1975

Tag der mündlichen Prüfung :

5.6.1975

Berichterstatter :

Prof.Dr. S. Ebel

Mitberichterstatter :

Prof.Dr. H. Klamberg

Die vorliegende Arbeit entstand an dem von Herrn  
Professor Dr.Dr.h.c. Horst Böhme und Herrn  
Professor Dr. Klaus Hartke geleiteten Institut  
für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittel-  
chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn  
auf Anregung und unter Anleitung von  
Herrn Professor Dr. Siegfried Ebel.

Für alle Hilfe und jegliche Unterstützung möchte  
ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.



## Inhaltsverzeichnis

### Seite

|        |                                                                                                  |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Einleitung                                                                                       | 1  |
| 2.     | Densitometrie mit on line-gekoppeltem<br>Rechner                                                 | 4  |
| 2.1.   | Fluoreszenzmessungen mit Chinin                                                                  | 4  |
| 2.1.1. | Gerätekombination                                                                                | 4  |
| 2.1.2. | Auswertemethode                                                                                  | 5  |
| 2.1.3. | Rechenprogramm                                                                                   | 6  |
| 2.1.4. | Ergebnisse                                                                                       | 8  |
| 2.1.5. | Methodenvergleich                                                                                | 10 |
| 2.2.   | Remissionsmessungen mit Phthalsäure                                                              | 12 |
| 2.2.1. | Auswertemethoden                                                                                 | 12 |
| 2.2.2. | Gerätekombination und Auswertung                                                                 | 12 |
| 2.2.3. | Einfluß der Fleckform                                                                            | 13 |
| 2.2.4. | Auftragesysteme                                                                                  | 14 |
| 2.2.5. | Ergebnisse und Diskussion                                                                        | 14 |
| 2.3.   | Fluoreszenzmessungen mit parabolischer Regression<br>am Beispiel der Bestimmung von Thiabendazol | 17 |
| 2.3.1. | Meßanordnung                                                                                     | 17 |
| 2.3.2. | Auswertung                                                                                       | 19 |
| 2.3.3. | Ergebnisse                                                                                       | 21 |

|        |                                                              |    |
|--------|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.     | Mehrkomponentenanalysen                                      | 22 |
| 3.1.   | Mehrkomponentenanalysen über Eichgeraden                     | 22 |
| 3.1.1. | Zweikomponenten                                              | 23 |
| 3.1.2. | Bestimmung von Phenacetin und Coffein                        | 23 |
| 3.1.3. | Auswertebedingung                                            | 24 |
| 3.1.4. | Ergebnisse                                                   | 26 |
| 3.2.1. | Dreikomponenten                                              | 27 |
| 3.2.2. | Bestimmung von Acetylsalicylsäure, Phenacetin<br>und Coffein | 27 |
| 3.2.3. | Rechenprogramm                                               | 28 |
| 3.2.4. | Chromatographiebedingungen                                   | 28 |
| 3.2.5. | Tablettenanalyse                                             | 32 |
| 3.2.6. | Ergebnisse                                                   | 33 |
| 4.     | In situ-Fluorimetrie durch Zweipunkteichung                  | 34 |
| 4.1.   | Übertragbarkeit von Eichfunktionen                           | 34 |
| 4.2.   | Zweipunkteichung                                             | 35 |
| 4.3.   | Vergleichende Auswertung                                     | 36 |
| 5.     | Standardzumischmethode                                       | 38 |
| 6.     | Auswertung mit internem Standard                             | 40 |
| 6.1.   | Bestimmung von Coffein durch in situ-Remission               | 40 |
| 6.1.1. | Methode                                                      | 40 |
| 6.1.2. | Auswahl der Standardsubstanz                                 | 41 |
| 6.1.3. | Reproduzierbarkeit                                           | 42 |
| 6.1.4. | Ergebnisse                                                   | 42 |

|         |                                                                           |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.2.    | Bestimmung von Acetylsalicylsäure durch in situ-Fluoreszenz               | 44 |
| 6.3.    | Zweikomponentenanalyse                                                    | 45 |
| 6.3.1.  | Acetylsalicylsäure und Coffein im Verhältnis 10 : 1                       | 45 |
| 7.      | Vergleich: Regression über Eichgeraden und Methode des internen Standards | 46 |
| 7.1.    | Dreikomponentenanalyse                                                    | 46 |
| 8.      | Einflußfaktoren des Standards                                             | 48 |
| 8.1.    | Vierkomponentenanalyse                                                    | 48 |
| 8.1.1.  | Lage des Standards                                                        | 48 |
| 8.1.2.  | Externer Standard                                                         | 50 |
| 9.      | Automatisierter Scanbetrieb durch Analogsteuerung                         | 53 |
| 9.1.    | Bestimmung von Aminophenazon                                              | 53 |
| 9.1.1.  | Durchführung und Problematik                                              | 53 |
| 9.1.2.  | Dreipunktauftragung                                                       | 54 |
| 9.1.3.  | Betrachtung des Zeitbedarfs                                               | 55 |
| 10.     | Linear- und Zick-Zack-Scansystem                                          | 57 |
| 10.1.   | Zick-Zack-Prinzip                                                         | 57 |
| 10.1.1. | Unsymmetrische Fleckzonen                                                 | 57 |
| 10.1.2. | Verteilung bei annähernd ideal runden Fleckzonen                          | 58 |
| 10.1.3. | "Fleckeindringtiefe"                                                      | 61 |
| 10.2.   | Vergleich: Fluoreszenz im Linear-, Remission im Zick-Zack-Scan            | 61 |

|       |                                       |    |
|-------|---------------------------------------|----|
| 10.3. | Fluoreszenzminderung                  | 62 |
| 10.4. | Schnellmethode mit dem Zick-Zack-Scan | 63 |
| 11.   | Peakunterdrückung                     | 68 |
| 12.   | Schlußbetrachtung                     | 73 |
|       | Anhang                                | 75 |
|       | Zeichenerklärung                      | 92 |
|       | Literaturverzeichnis                  | 93 |
|       | Lebenslauf                            | 96 |

## 1. Einleitung

In der Analytik pharmazeutischer Zubereitungen, wie z.B. bei Pulvern, Tabletten, Dragees oder Lösungen, müssen vor der Bestimmung der einzelnen Komponenten mehr oder weniger aufwendige Trennoperationen durchgeführt werden, z.B. Extraktionen mit bestimmten Lösungsmitteln bei verschiedenen pH-Werten. Wesentlich einfacher gestalten sich chromatographische Trennverfahren. Der Anwendung der Gaschromatographie, die z. Zt. als genauestes Verfahren gilt, ist durch die Thermolabilität der zu bestimmenden Substanzen oftmals eine Grenze gesetzt. Es empfiehlt sich in vielen Fällen, auf die quantitative Dünnschichtchromatographie (DC) auszuweichen. Begleitsubstanzen, wie z.B. technologische Hilfsstoffe, stören die Bestimmung nicht. Durch Variation von Schicht, Laufmittel und Kammertyp, sowie anderer physikalischer Bedingungen, insbesondere Luftfeuchtigkeit und Temperatur, kann man nahezu beliebige Trennprobleme in allen Stoffklassen lösen, vorausgesetzt, daß die Substanzen nicht zu flüchtig oder allzu schwerlöslich sind. Da Dünnschichtplatten zumeist nach optischen Verfahren ausgewertet werden, müssen die zu bestimmenden Substanzen absorbieren oder fluoreszieren. Sind diese Eigenschaften nicht vorhanden, kann man sie auch künstlich erzeugen, fehlende Absorption im UV durch Herstellen von Farbreaktions- oder Verkohlungsprodukten (1, 2), wodurch die grossen Stoffklassen der Zucker (3) und Lipide (4) zugänglich werden. Hierbei ergeben sich jedoch durch die Veränderung des Plattenuntergrundes Schwierigkeiten bei der quantitativen Auswertung (5). Nicht fluoreszierende Stoffe lassen sich oftmals als Dansylderivate fluorimetrisch bestimmen (6). Es werden verschiedene indirekte Verfahren eingesetzt, um dünnschichtchromatographisch getrennte Substanzen quantitativ zu erfassen: Elutionsmethoden mit anschließender UV-photometrischer (7), fluorimetrischer (8), polarographischer (9) oder titrimetrischer (10) Bestimmung. Besonders erwähnt sei noch der Einsatz säurelöslicher Sorbentien (11-13). Alle Methoden sind jedoch mit einer aufwendigen Transfertechnik verbunden.

In zunehmendem Maße werden sie abgelöst durch die densitometrische Auswertung von Dünnschichtplatten, auch in situ-Messung genannt (14-19). Mit dem Einsatz moderner Densitometer, z.B. von ZEISS, SCHOEFFEL oder SHIMADZU, verbinden sich Zeitgewinn mit höherer Präzision und Empfindlichkeit, als man sie bei allen genannten indirekten Verfahren oder der Methode des visuellen Fleckflächenvergleichs (20, 21) erzielen kann.

Die Dünnschichtchromatographie erreicht nun ihren optimalen Einsatz im Nano- und unteren Mikrogrammbereich.

Unter den zahlreichen in situ-Meßmethoden (22) hat sich die Remission wegen ihrer universellen Einsatzmöglichkeit im UV und sichtbaren Spektralbereich bzw. die Fluoreszenz wegen ihrer Empfindlichkeit im unteren Nanogrammbereich und ihrer weniger großen Anfälligkeit bei Fleckdeformationen (23) am besten bewährt. Bei Transmissionsmessungen ergibt sich wegen immer vorhandener Korngrößen- und Schichtdickenschwankungen des Sorbens ein ungünstiges Signal-Rauschverhältnis (24). Die Kombination von Remission und Transmission bringt diesbezüglich Vorteile (25), ihr Einsatz beschränkt sich jedoch auf den sichtbaren Spektralbereich und ist deshalb für die speziellen Belange der pharmazeutischen Analytik kaum anwendbar. Die Fluoreszenzlöschung ist zu unempfindlich und durch die Remissionsmethode abgelöst worden.

Diese Meßanordnungen können mit Densitometern verschiedenster Konstruktionsprinzipien im Einstrahl-, Zweistrahl- und Zweiwellenlängenverfahren (27) ausgeführt werden. EBEL und KUSSMAUL simulierten diese Verfahren an Hand von digitalisierten Remissions-Ortskurven und führten eine Fehlerbetrachtung durch (28). Schließlich variiert man auch das Abtastprinzip. Man kann bei punktförmiger Auftragechnik mit einem in Länge und Breite verstellbaren, rechteckigen Meßspalt einen Fleck, in der ganzen Breite erfassend, linear scannen oder ihn mit einem quadratischen Meßspalt nach dem Zick-Zack-Verfahren segmentieren (29) und die Einzelflächen aufaddieren oder bei bandförmigen Fleckzonen einen aliquoten Teil im Linearscan erfassen (23).

Trotz des Einsatzes moderner Meßtechniken ist die erreichbare Präzision bei der quantitativen DC begrenzt. Bereits die Auftragetechnik, ob punkt- oder bandförmig, bedingt eine relative Fehlerbreite (30). Hinzu kommen die sich während des Trennprozesses ändernde Fließmittelzusammensetzung, die RÖDER veranlaßte, isobare Gemische einzusetzen (31), sich senkrecht zur Entwicklungsrichtung ausbildende Plattengradienten (32) und die schon erwähnten Unregelmäßigkeiten der Sorptionschicht (33), auch bei Fertigplatten, welche die diffuse Reflexion auf opakem Untergrund beeinflussen. Ein prinzipieller Nachteil besteht auch darin, daß auf jeder Dünnschichtplatte eine Eichfunktion erstellt werden muß, wodurch der Platz für Analysen eingeschränkt wird.

Die Bedienung eines Densitometers durch Einstellen der Eich- und Analysenbahnen bzw. das Positionieren der Chromatogrammzonen von Hand ist mit Zeitaufwand verbunden, noch mehr die graphische Auswertung analog registrierter Meßkurven.

Diese Schwierigkeiten und Probleme sollen unter Einsatz der verschiedenen densitometrischen Meßprinzipien bei punktförmiger Auftragetechnik im Linear-, später auch im Zick-Zack-Scan im wesentlichen an Fluoreszenz- und Remissionsbeispielen diskutiert und zu lösen versucht werden. Bei variiert Chromatographier- und Auftragetechnik, unter Anwendung spezieller Auswerteverfahren, erfolgt die on line-Kopplung der Meßsysteme mit Kleinrechnern und schließlich die Automatisierung des DC-Scanners durch ein analoges Steuersystem (34). Es wird die Voraussetzung geschaffen für den Einsatz von Tischrechnern mit größerer Kapazität, die neben der Auswertung der anfallenden Analysendaten auch die Densitometersteuerung übernehmen sollen (34).

## 2. Densitometrie mit on line-gekoppeltem Rechner

### 2.1. Fluoreszenzmessungen mit Chinin

Am Beispiel dieses Alkaloids, das in der Fluoreszenzspektroskopie als Standard- oder Bezugssubstanz verwendet wird, soll die on line-Kopplung eines programmierbaren Tischrechners (DIEHL COMBITRON S) über einen Integrator (INFOTRONICS CRS 104) zur quantitativen Auswertung für die in situ-Fluorimetrie (DC-Scanner von ZEISS) beschrieben werden.

Chinin ist - zumindest als Festsubstanz und in Lösung - photochemisch stabil. Man sollte jedoch beim Scannen auf gleiche Behandlung von Eich- und Analysenflecken achten. Bei mehrmaliger Auswertung derselben Platte ergeben sich niedrigere Meßwerte, ebenso nach längerer Lagerung nicht gescannter Chromatogramme. Diese Veränderung wird ausgelöst durch die besonders feine Verteilung der unter Lichteinfluß stehenden Substanz auf der aktiven Oberfläche Kieselgel. Die densitofluorimetrische Bestimmung von Chinin durch graphische Auswertung registrierter Ortskurven wurde von MUTSCHLER (36) beschrieben.

#### 2.1.1. Gerätekombination

Die einfache Auswertefunktion der Fluorimetrie,  $I_{fl} \sim c$ , veranlaßte uns, eine Densitometer/Integrator/Rechner on line-Kopplung durchzuführen (Abb.1).



Abb.1

Das analoge Ausgangssignal des Densitometers wird dem Integrator zugeführt. Es ist zu beachten, daß die Verstärkungseinstellung am Anzeigegerät ( ZEISS ) so gewählt wird, daß die unvermeidbare Untergrundfluoreszenz der verwendeten DC-Platten ein Ausgangssignal ergibt, das noch eindeutig im Nachziehbereich der Basislinienkorrektur des Integrators liegt. Der INFOCALC-Ausgang ermöglicht ohne weitere Anpassung eine direkte Datenübergabe zum programmierbaren Tischrechner.

### 2.1.2. Auswertemethode

Betrachtet man den Verlauf der Ortsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität (Abb.2), erkennt man, daß in vielen Fällen die Basislinie vor und hinter dem Fleck nicht identisch ist.

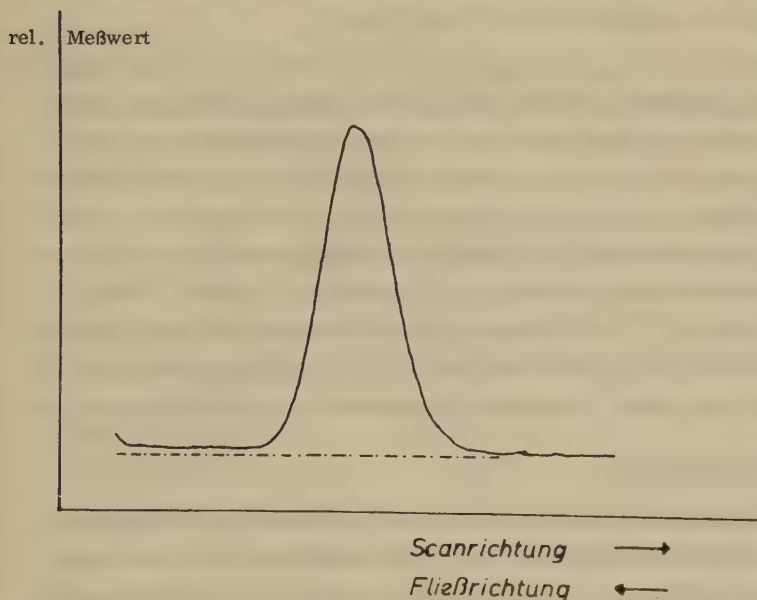


Abb.2: Fluoreszenz-Ortskurve

Dies ist einmal durch die immer vorhandene Untergrundfluoreszenz und Inhomogenität der verwendeten DC-Platten bedingt. Andererseits treten auch durch Verunreinigungen der Fließmittel, selbst bei p.a. Qualität, Untergrundfluoreszenzen auf, deren Intensität meist in Fließrichtung zunimmt.

Bei einer Integration der Meßkurve in Fließrichtung würde man zu große, bei Integrationen entgegengesetzt zu kleine Peakflächen erhalten. Es wird deshalb folgendermaßen ausgewertet: Man integriert zunächst in Fließrichtung, nach Durchfahren des Fleckes schaltet man die Richtung des automatischen Tischvorschubes um und integriert entgegengesetzt. Diesen Vorgang kann man noch ein- oder zweimal wiederholen. Der on line-gekoppelte Rechner ermöglicht es nun ohne weiteres, den Mittelwert über alle Flächenintegrale zu bilden. Hierdurch wird die erwähnte Basisliniendrift eliminiert. Darüber hinaus werden durch die Mittelwertbildung auch Fehler, die bei der elektronischen Peakerkennung auftreten können und bei unseren Messungen 0,5 % betragen (Tab. 23), weitgehendst ausgeglichen. Durch das bei der DC-Auswertung im Vergleich zur Gaschromatographie höhere Grundrauschen, zum Teil gerätebedingt, zum Teil durch die Sorptionsschicht hervorgerufen, kann eine einmalige Integration zu wesentlich höheren Fehlern führen.

Wie bei allen in situ-Analysen ist es notwendig, die Eichfunktion, also den Zusammenhang zwischen Meßgröße und Substanzmenge, auf der Platte zu bestimmen, auf der auch die Analyse durchgeführt wird. Man muß also in jedem Fall eine Reihe von Eichflecken bekannten Gehaltes - im Rahmen dieser Untersuchung wurden vier Eichflecke ausgewertet - mitchromatographieren. Der Rechner ermittelt nach der Methode der minimalen Summe der Fehlerquadrate die wahrscheinlichste Gerade, über die nach anschließendem Vermessen der Analysenflecke die unbekannte Substanzmenge ermittelt wird. Zur Fehlerkontrolle bei der Festlegung der Eichgeraden berechnet man zusätzlich den Korrelationskoeffizienten. Die Eichgerade approximiert die Meßwerte umso besser, je geringer die Abweichung dieses Koeffizienten von 1 ist.

### 2.1.3. Rechenprogramm

Über ein allgemeines Programm zur Auswertung von Analysen über Eichgeraden für die DIFHL COMBITRON S wurde von uns bereits berichtet (37). Eine Eichgerade ist durch die Steigung ( $m$ ) und den Ordinatenabschnitt ( $b$ ) eindeutig festgelegt (Gleichung 1, 1a). Die Werte für diese beiden Parameter ergeben sich aus den Gleichungen 2 bis 4, der Korrelationskoeffizient ( $k$ ) errechnet sich nach Gleichung 5.

$$y = mx + b \quad (1)$$

$$F = m \cdot c + b \quad (1a)$$

$$m = \frac{\sum c_i \sum F_i - n \sum c_i \cdot F_i}{(\sum c_i)^2 - n \sum c_i^2} \quad (2)$$

$$b = \frac{\sum c_i \sum c_i \cdot F_i - \sum c_i^2 \sum F_i}{(\sum c_i)^2 - n \sum c_i^2} \quad (3)$$

$$b = \frac{1}{n} (\sum F_i - m \sum c_i) \quad (4)$$

$$k = \frac{n \cdot \sum c_i F_i - \sum c_i \sum F_i}{\sqrt{[n \sum c_i^2 - (\sum c_i)^2] \cdot [n \sum F_i^2 - (\sum F_i)^2]}} \quad (5)$$

Das Rechenprogramm umfaßt drei Teile:

- Elimination des Integratorzeitwertes durch Abtrennen der Vorkommastellen,
- Bildung der Summen und Produktsummen

$$\sum c_i, \sum c_i F_i, \sum c_i^2, \sum F_i$$

und für die Berechnung von k

$$\sum F_i^2$$

- Berechnen von m, b, k
- Analysenrechnung.

Bei der begrenzten Speicherkapazität eines Kleinrechners erfolgt sowohl die Programmierung in Teilabschnitten, als auch die Eingabe von numerischen Daten und Funktionsbefehlen extern, in unserem Fall über Lochstreifen. Als Konsequenz des seriellen Einlesens ergibt sich, daß die Reihenfolge des Arbeitsablaufes festgelegt ist. Das Chromatogrammschema (Abb. 3) macht deutlich, daß, von links beginnend, zunächst die Eichwerte in festgelegter Reihenfolge, dann die Analysen ausgewertet werden.

Meßtechnisch muß man dafür sorgen, daß keine zusätzlichen Störpeaks auftreten und die Reihenfolge durcheinanderbringen. Dies ist jedoch durch richtiges Abstimmen der Integratorparameter, wie Rauschunterdrückung, Variation von Peakgröße und Peakdauer, ohne weiteres möglich.

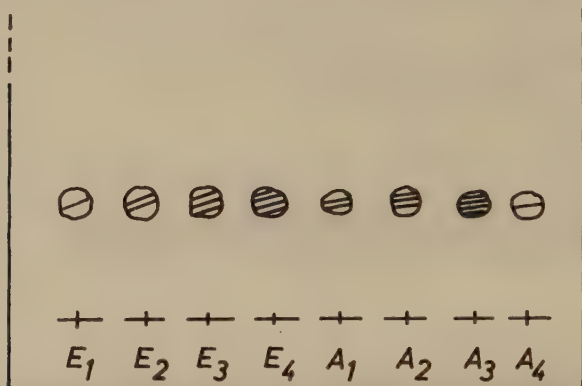


Abb.3: Auftrageschema<sup>+)</sup> , festgelegte Eichreihen bei variabler Analysenfolge

<sup>+)</sup>  Im weiteren Verlauf hat sich als zusätzliche Störungsquelle bei der in situ-Auswertung das Auftreten von Plattengradienten quer zur Entwicklungsrichtung herausgestellt. Es ist deshalb oftmals besser, das Auftrageschema so zu modifizieren:

$E_1 \quad A_1 \quad E_2 \quad A_2 \quad E_3 \quad A_3 \quad E_4 \quad A_4$  ,

da dann der Plattengradient unmittelbar in die Eichfunktion miteingeht.

#### 2.1.4. Ergebnisse

Die nach dem hier beschriebenen on line-Betrieb ermittelte relative prozentuale Näherungsstandardabweichung aller 32 Analysenflecken auf 8 Platten im Bereich von 10 bis 40 ng Chinin/Fleck beträgt 1.75 % ( Tab.1 ). Diese Zahl setzt sich additiv zusammen aus der mit 1.2 % ( Tab.24 ) erzielten Reproduzierbarkeit des Auftragesystems UNIMETRICS ( 1  $\mu$ l Präzisionsspritze mit 90° abgeschliffener Nadel, 0.4  $\mu$ l Einzeldosis ) und dem Integratorfehler von 0.5 %. Ein zusätzlicher Fehler tritt nicht auf. Tab.2 und 3 geben Aufschluß über den Fehler bei verschiedenen Platten, sowie eine Abhängigkeit von der Konzentration.

Tabelle 1

| Platte | ng Chinin  |          | Fehler |        |
|--------|------------|----------|--------|--------|
|        | vorgegeben | gefunden | [ng]   | [%]    |
| 1      | 10,00      | 10,06    | 0,06   | 0,6    |
| 2      |            | 9,89     | - 0,11 | - 1,1  |
| 3      |            | 9,63     | - 0,37 | - 3,7  |
| 4      |            | 9,65     | - 0,35 | - 3,5  |
| 5      |            | 10,05    | 0,05   | 0,5    |
| 6      |            | 10,16    | 0,16   | 1,6    |
| 7      |            | 10,25    | 0,25   | 2,5    |
| 8      |            | 9,81     | - 0,19 | - 1,9  |
| 1      | 20,00      | 20,22    | 0,22   | 1,1    |
| 2      |            | 19,96    | - 0,04 | - 0,2  |
| 3      |            | 19,42    | - 0,58 | - 2,9  |
| 4      |            | 19,54    | - 0,46 | - 2,3  |
| 5      |            | 19,76    | - 0,24 | - 1,2  |
| 6      |            | 20,51    | 0,51   | 2,55   |
| 7      |            | 20,35    | 0,35   | 1,75   |
| 8      |            | 19,73    | - 0,27 | - 1,35 |
| 1      | 30,00      | 29,40    | - 0,60 | - 2,0  |
| 2      |            | 29,56    | - 0,44 | - 1,47 |
| 3      |            | 29,51    | - 0,49 | - 1,63 |
| 4      |            | 29,33    | - 0,67 | - 2,23 |
| 5      |            | 29,82    | - 0,18 | - 0,6  |
| 6      |            | 30,43    | 0,43   | 1,43   |
| 7      |            | 29,98    | - 0,02 | - 0,07 |
| 8      |            | 30,53    | 0,53   | 1,77   |
| 1      | 40,00      | 39,65    | - 0,35 | - 0,86 |
| 2      |            | 39,39    | - 0,61 | - 1,53 |
| 3      |            | 39,65    | - 0,35 | - 0,86 |
| 4      |            | 39,39    | - 0,61 | - 1,53 |
| 5      |            | 39,93    | - 0,07 | - 0,15 |
| 6      |            | 40,10    | 0,10   | 0,25   |
| 7      |            | 40,05    | 0,05   | 0,13   |
| 8      |            | 40,54    | 0,54   | 1,53   |

$$\sigma_{\text{rel-\%}} = 1.75$$

Tabelle 2

| Platte | $\sigma_{\text{rel-\%}}$ | Platte | $\sigma_{\text{rel-\%}}$ |
|--------|--------------------------|--------|--------------------------|
| 1      | 1,45                     | 5      | 0,83                     |
| 2      | 1,38                     | 6      | 1,93                     |
| 3      | 2,92                     | 7      | 1,76                     |
| 4      | 2,87                     | 8      | 1,85                     |

Tabelle 3

| Vorgegebene Menge<br>Chinin<br>[ ng ] | Gefundene Menge<br>Chinin<br>[ ng ] | $\sigma_{\text{rel-\%}}$ |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 10                                    | 9,94                                | 2,40                     |
| 20                                    | 19,94                               | 1,99                     |
| 30                                    | 29,82                               | 1,66                     |
| 40                                    | 39,84                               | 1,08                     |

### 2.1.5. Methodenvergleich

Um einen einwandfreien Vergleich verschiedener Auswertemethoden zu ermöglichen, wurde das Ausgangssignal des Densitometers gleichzeitig einem parallel geschalteten Schreiber zugeführt. So war es möglich, von ein und demselben Fleck in einem Arbeitsgang die Fluoreszenz-Ortskurve neben der elektronisch integrierten Fläche zu erhalten. Anschließend werteten wir nach folgenden Methoden aus:

- 1) Peakhöhe der Fluoreszenz-Ortskurve
- 2) Peakhöhe x Halbwertsbreite
- 3) Integration der Meßkurve, Einzelauswertung
- 4) Hier beschriebene Methode, Mittelwerte von Vor- und Rückscans.

Tabelle 4 enthält die Korrelationskoeffizienten der Eichgeraden sowie die relativen Näherungsstandardabweichungen aller Auswertungen am Beispiel einer Platte.

Tabelle 4

| Verfahren                     | K      | $\sigma_{\text{rel (n=4)}}$ |
|-------------------------------|--------|-----------------------------|
| Peakhöhe                      | 0,9998 | 4,38                        |
| Peakhöhe x<br>Halbwertsbreite | 0,9993 | 2,00                        |
| Elektronische<br>Integration  | 0,9999 | 1,84                        |
| Hier beschriebene<br>Methode  | 0,9999 | 1,68                        |

Bei höherer Präzision und geringerer Fehleranfälligkeit ergibt sich bei dem hier beschriebenen on line-Verfahren trotz mehrerer Scans pro Bahn ein enormer Zeitgewinn gegenüber der graphischen Auswertung.

Das eingesetzte Chinin wurde als Reinsubstanz angesehen (Nebenalkaloide  $< 1\%$ ). Ein Gehalt an anderen Chinaalkaloiden sowie ein Einwaagefehler haben auf den Methodenvergleich keinen Einfluß, allenfalls auf eine Absolutbestimmung in einer anderen Probe. Es empfiehlt sich dann, chromatographisch gereinigtes Chinin (8,39) zu verwenden.

## 2.2. Remissionsmessungen mit Phthalsäure (46)

Der Einsatz der Remissionsanalyse im on line-Betrieb soll am Beispiel der Bestimmung von Phthalsäure demonstriert werden.

### 2.2.1. Auswertemethoden

Zur Auswertung stehen im Prinzip zwei Verfahren zur Verfügung:

- Die Auswertung über die Remissionsgrad-Ortskurve
- Die Auswertung über die KUBELKA-MUNK-Funktion (40).

Die Fläche unter der Remissionsgrad-Ortskurve ist eine Funktion der Substanzmenge des DC-Fleckes, für die allerdings eine explizite mathematische Lösung nicht bekannt ist. In den meisten Fällen rechnet man mit einer quadratischen Abhängigkeit, d.h. innerhalb gewisser Konzentrationsbereiche ist  $F^2$  proportional der Substanzkonzentration  $c$  (15). Darüber hinaus gibt es auch die Möglichkeit, über logarithmische oder reziproke Eichzusammenhänge zu arbeiten (41). Bei der Auswertung über die KUBELKA-MUNK-Funktion geht man von Gleichung (6) aus.

Im einfachsten Fall arbeitet man über

$$R = \frac{(1 - R_{\text{abs}})^2}{2 R_{\text{abs}}} \quad (6)$$

die entsprechend ungerechnete Peakhöhe (42). Aufwendiger ist die Methode über Peakhöhe und Halbwertsbreite (43). Sehr genau, jedoch mit einem hohen Rechenaufwand verbunden, ist die numerische Integration der in ihrem gesamten Verlauf nach KUBELKA-MUNK gewandelten Remissionsgrad-Ortskurve (44).

### 2.2.2. Gerätekombination und Auswertung

Bei prinzipiell gleicher Geräteanordnung wie bei der Fluorimetrie muß jetzt das Ausgangssignal des Einstrahlscanners elektronisch gewandelt werden. Integratoren können nur positive Peaks erfassen. Die Null-Linie des ZEISS-Densitometers liegt bei +5 bzw. +10 mV, die negative Peaklage folgt aus dem Remissionssignal.

Zur Wandlung des Signals können entweder der Remissionszusatz von INFOTRO-NICS oder der Spreitzzusatz von ZEISS verwendet werden. Der INFOCALC-Ausgang des verwendeten Integrators ermöglicht wiederum die direkte Datenübergabe zum programmierbaren Tischrechner.

Der Auswertung wurde der lineare Zusammenhang zwischen dem Flächenquadrat der Remissionsgrad-Ortskurve und der Substanzmenge im DC-Fleck zugrunde gelegt. Das bisher angewendete Rechenprogramm ändert sich nur geringfügig durch Bilden der Flächenquadrate. Durch diesen Rechenschritt ergeben sich ausgeprägtere Differenzen zwischen den Meßwerten von Vor- und Rückscan, weshalb die Mittelwertbildung hier noch wichtiger ist als bei der DC-Fluorimetrie.

### 2.2.3. Einfluß der Fleckform

Bei der Remission gehen neben der Intensität auch Form und Größe der Flecke in die Messung mitein. Man sollte ansteigende Konzentrationen zur Aufstellung einer Eichbeziehung nur mit konstanten Volumina auftragen, um flächengleiche Fleckzonen bei variabler Intensität zu messen. Kleine Auftragevolumina haben den Vorteil, daß Schwankungen beim Auslauf aus dem Dosiersystem auf die Platte relativ gering sind und reproduzierbare Startzonen hinsichtlich Form und Größe ermöglichen. Neuerdings wird vorgeschlagen, den Auslauf größerer Flüssigkeitsmengen durch Leitfähigkeitsmessung zu regeln (54).

Eingehende Untersuchungen von KLAUS (63) machen deutlich, daß bei kleinen Auftragemengen nur geringe Substanzkonzentrationen appliziert werden dürfen, um die Fleckzonen nicht zu überladen, da anderenfalls konkave Krümmungen der Eichgeraden die unmittelbare Folge sind. Außerdem verlaufen die meisten Sorptionsisothermen nicht mehr linear, vor allem dann, wenn sie sehr steil sind. Es kommt zu Verschlechterung der Trennung und zur typischen Schwanzbildung der Fleckzonen.

Im Laufe der chromatographischen Entwicklung kann die primäre Fleckform durch Gradienteneinwirkung verschiedenster Art deformiert werden. Auf diesen nicht auszuschließenden Sekundäreffekt und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die in situ-Messung soll an anderer Stelle eingegangen werden (s. Kap. 3.2.3.).

#### 2.2.4. Auftragesysteme

Aus qualitativen und quantitativen Erwägungen heraus nimmt die Auftragestechnik in der DC-Literatur einen breiten Raum ein. Man unterscheidet hauptsächlich Spritzen- und Kapillarsysteme. Einzel- oder auch Mehrfachspritzen für die DC im Senkrechtbetrieb mit  $90^{\circ}$  abgeschliffener Nadel, sonst auch abgeschrägt, können folgende Nachteile haben: Verschleppung von Lösungsmittelresten, Totvolumen, Einschluß von Luftblasen, bei Graduation Parallaxenfehler.

Bei unseren Versuchen setzten wir primär selbstauslaufende, längenkalibrierte Mikrokapillaren in der Sonderanfertigungsgröße von  $0.5 \mu\text{l}$  (Microcaps) ein. Diese haben nicht die genannten Fehler und sind auch einfach in der Handhabung. Die eigentlich für den Einmalgebrauch gedachten Kapillaren kann man mehrfach benutzen und dadurch die mit  $\leq 1\%$  angegebene Volumenschwankung der Kapillaren untereinander ausschließen. Verschleppungsgefahr besteht nicht, wenn man die Kapillare jeweils mit der folgenden Lösung mehrfach durchspült. Bei Verwendung von äthanolischen, chloroformischen oder acetonschen Auftragslösungen ist keine nennenswerte Adsorption an der Glaswand beobachtet worden. Problematischer ist dies bei wäßrigen Lösungen. Im Falle der Phthalsäure konnten wir bei Auswertung über die Flächen der Remissionsgrad-Ortskurven einen Auftragsfehler von  $0.8\%$  ermitteln (Tab. 25).

#### 2.2.5. Ergebnisse und Diskussion

Bei der Bestimmung von Phthalsäure im Bereich von 2 bis  $5 \mu\text{g}$  wurden pro Platte 4 Analysen über 4 Eichkonzentrationen ausgewertet. Die Tabellen 5 bis 7 geben Aufschluß über die Genauigkeit des Verfahrens.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Fluoreszenzauswertung, erkennt man hier trotz etwas höherer Präzision bei der Auftragung mit Mikrokapillaren größere Streuungen. Drei Faktoren tragen dazu bei:

- Unterschiedliche Fleckform und damit verbundene unregelmäßige Substanzverteilung in der Fleckzone beeinflussen die Remissionsanalyse.
- Inhomogenitäten der Sorptionsschicht können sich auswirken, da Oberflächengradienten, Änderung der Korngrößenverteilung und Schwankungen der Schichtdicke in die Messung eingehen.

Bei selbstgestrichenen Platten hilft man sich mit stärkerer Dämpfung des Integratoranalogteiles zur Peakerkennung. Hierdurch ergeben sich jedoch signifikante Abweichungen der Meßwerte bei Vor- und Rückscan derselben Fleckzonen. Man sollte in situ-Analysen überhaupt nur mit Fertigplatten durchführen. Diese haben bereits einen beachtlichen Qualitätsstand erreicht.

- Durch Anwenden der Auswertefunktion  $c \propto F^2$  ist der Fehler zwangsläufig höher als bei der Rechnung mit einfachen Flächen.

Tabelle 5

| Platte | $\mu\text{g}$ Phthalsäure |          | Fehler            |         | Platte | $\mu\text{g}$ Phthalsäure |          | Fehler            |         |
|--------|---------------------------|----------|-------------------|---------|--------|---------------------------|----------|-------------------|---------|
|        | vor-<br>gegeben           | gefunden | ( $\mu\text{g}$ ) | (%)     |        | vor-<br>gegeben           | gefunden | ( $\mu\text{g}$ ) | (%)     |
| 1      | 2                         | 2,06     | + 0,06            | + 3,0   | 1      | 4                         | 3,88     | - 0,12            | - 3,0   |
| 2      |                           | 2,09     | + 0,09            | + 4,5   | 2      |                           | 3,97     | - 0,03            | - 0,8   |
| 3      |                           | 2,00     | $\pm$ 0           | $\pm$ 0 | 3      |                           | 4,06     | + 0,06            | + 1,5   |
| 4      |                           | 2,02     | + 0,02            | + 1,0   | 4      |                           | 3,98     | - 0,02            | - 0,5   |
| 5      |                           | 2,06     | + 0,06            | + 3,0   | 5      |                           | 4,06     | + 0,06            | + 1,5   |
| 6      |                           | 2,05     | + 0,05            | + 2,5   | 6      |                           | 4,07     | + 0,07            | + 1,8   |
| 7      |                           | 2,04     | + 0,04            | + 2,0   | 7      |                           | 4,09     | + 0,09            | + 2,3   |
| 8      |                           | 2,03     | + 0,03            | + 1,5   | 8      |                           | 3,94     | - 0,06            | - 1,5   |
| 9      |                           | 2,01     | + 0,01            | + 0,5   | 9      |                           | 4,00     | $\pm$ 0           | $\pm$ 0 |
| 10     |                           | 2,05     | + 0,05            | + 2,5   | 10     |                           | 3,88     | - 0,12            | - 3,0   |
| 1      | 3                         | 2,93     | - 0,07            | - 2,3   | 1      | 5                         | 5,09     | + 0,09            | + 1,8   |
| 2      |                           | 3,03     | + 0,03            | + 1,0   | 2      |                           | 5,12     | + 0,12            | + 2,4   |
| 3      |                           | 2,86     | - 0,14            | - 4,7   | 3      |                           | 5,02     | + 0,02            | + 0,4   |
| 4      |                           | 2,88     | - 0,12            | - 4,0   | 4      |                           | 4,98     | - 0,02            | - 0,4   |
| 5      |                           | 2,90     | - 0,10            | - 3,3   | 5      |                           | 4,97     | - 0,03            | - 0,6   |
| 6      |                           | 2,92     | - 0,08            | - 2,7   | 6      |                           | 5,06     | + 0,06            | + 1,2   |
| 7      |                           | 2,89     | - 0,11            | - 3,7   | 7      |                           | 4,99     | - 0,01            | - 0,2   |
| 8      |                           | 2,97     | - 0,03            | - 1,0   | 8      |                           | 5,06     | + 0,06            | + 1,2   |
| 9      |                           | 3,03     | + 0,03            | + 1,0   | 9      |                           | 5,23     | + 0,23            | + 0,5   |
| 10     |                           | 3,03     | + 0,03            | + 1,0   | 10     |                           | 5,02     | + 0,02            | + 0,4   |

Tabelle 6

| Platte | % rel. | Platte | % rel. |
|--------|--------|--------|--------|
| 1      | 2,98   | 6      | 2,59   |
| 2      | 3,03   | 7      | 2,74   |
| 3      | 2,84   | 8      | 1,52   |
| 4      | 2,41   | 9      | 2,73   |
| 5      | 2,75   | 10     | 2,34   |

Tabelle 7

| Vorgegebene Menge<br>Phthalsäure ( $\mu\text{g}$ ) | Gefundene Menge<br>Phthalsäure ( $\mu\text{g}$ ) | % rel. |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| 2                                                  | 2,04                                             | 2,54   |
| 3                                                  | 2,94                                             | 2,96   |
| 4                                                  | 3,99                                             | 1,93   |
| 5                                                  | 5,05                                             | 1,94   |

## 2.3. Fluoreszenzmessungen mit parabolischer Regression am Beispiel der Bestimmung von Thiabendazol (47)

Thiabendazol, 2 (4 -Thiazolyl )-benzimidazol, ist seit 1972 (49) zur Oberflächenbehandlung von Zitrusfrüchten und Bananen als Fungizid zugelassen, wobei vom Gesetzgeber gleichzeitig eine Maximalkonzentration festgelegt wird. Diese beträgt bei Zitrusfrüchten 6 ppm und bei Bananen 3 ppm. Neben dem qualitativen Nachweis ist folglich eine quantitative Bestimmung erforderlich. Wegen der relativ geringen Substanzmengen kommen hierfür nur Mikroverfahren in Betracht. Die Aufarbeitung von pflanzlichem Material wurde zuerst von KROELLER (48) am Beispiel der Analyse von Thiabendazol in Tabak und Tabakrauch beschrieben. Dieses Verfahren wurde von OTTENEDER (51) und HEY (50) für die quantitative Erfassung des Thiabendazols in Zitrusfrüchten leicht modifiziert. Nach der Extraktion erfolgt eine dünnschichtchromatographische Reinigung. Während HEY anschließend eluiert und fluorimetrisch oder gaschromatographisch bestimmt, wird bei dem Verfahren nach OTTENEDER (51) die quantitative Bestimmung durch Remissionsmessung direkt auf der Dünnschichtplatte durchgeführt. Die fluorodensitometrische Analyse stieß bislang auf zwei Schwierigkeiten:

- Im Gegensatz zu Lösungen von Thiabendazol in 0.1 N Salzsäure, Dimethylformamid oder Methanol, die weitgehendst photochemisch stabil sind, zeigt die DC-getrennte Substanz eine ganz charakteristische Photolabilität.

Durch die teilweise Überlappung der Exzitations- und Emissionsbande tritt Reabsorption ein, d.h. es resultiert bei der quantitativen Fluoreszenzspektroskopie erst bei Konzentrationen  $< 10^{-5}$  M ein linearer Zusammenhang zwischen Meßwert und Substanzmenge (50).

### 2.3.1. Meßanordnung

Zur Vermeidung von photochemischen Reaktionen muß man mit möglichst geringen Lichtintensitäten anregen. Es eignen sich Densitometer, bei denen das Anregungslicht schmalbandig monochromatisch zerlegt werden kann. Wegen der benachbarten Lage der Anregungs- und Fluoreszenzbande ( $\lambda_{\text{Exz.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Fluor.}} = 355 \text{ nm}$ , unkorrigierte Werte) ist es weiterhin von Vorteil, wenn auch das Fluoreszenzlicht spektral zerlegt werden kann.

Hierdurch läßt sich der gestreute Anteil des Erregerlichtes, der den Photomultiplier erreicht, herabsetzen. Prinzipiell ist es jedoch auch möglich, störende Anteile des Erregerlichtes mit einem Kantenfilter vor dem Empfänger zu eliminieren. Für unsere Messungen standen uns zwei verschiedene Geräte zur Verfügung, das ZEISS-DC-Spektralphotometer ( ein Monochromator, Prinzip der Meßanordnung vgl. Abb.4 oben ) und das HITACHI-PERKIN ELMER Fluorimeter MPF 3 A mit Dünnschichtscanner ( zwei Monochromatoren, Prinzip der Meßanordnung vgl. Abb.4 unten ).

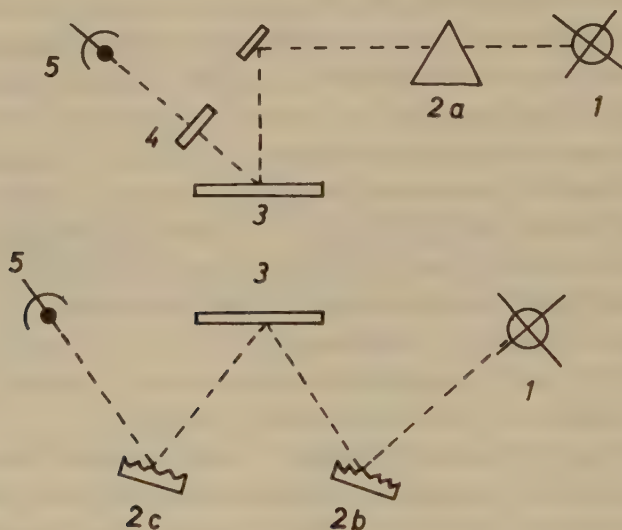


Abb.4:

(oben) Prinzipielle Meßanordnung ZEISS-DC-Photometer.

(unten) Prinzipielle Meßanordnung HITACHI-PERKIN ELMER Fluorimeter.

1 Lampe ( Hg oder Xe )

2 Monochromator

a) Prisma, Anregung

b) Gitter, Anregung

c) Gitter, Emission

3 DC-Platte

4 Kantenfilter

5 Empfänger ( Photomultiplier )

nicht gezeichnet sind evtl. vorhandene optische Zwischensysteme.

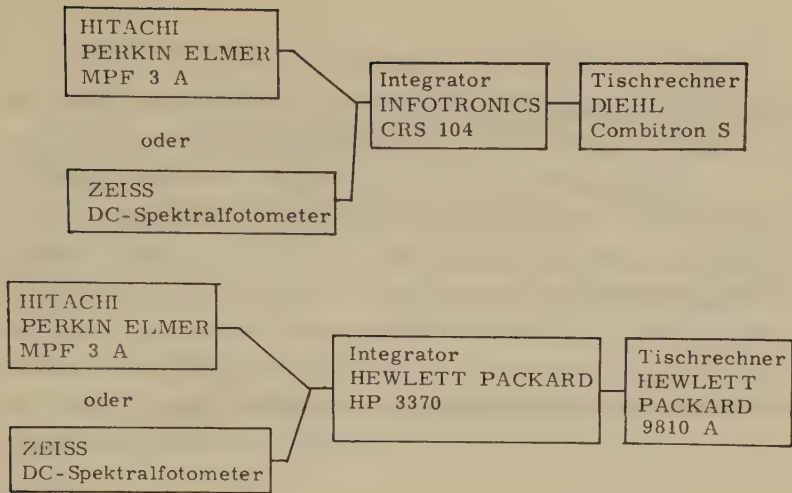


Abb.5

Die Ergebnisse, die mit beiden Geräten im Integrator /Rechner on line-Betrieb ( Abb.5 ) unter Verwendung jeweils derselben DC-Platten erzielt wurden, zeigen keine signifikanten Unterschiede. Diese Tatsache erklärt sich aus der besseren optischen und elektronischen Leistung des HITACHI-PERKIN ELMER -Gerätes, während der ZEISS-Scanner in seinem mechanischen Teil überlegen ist.

#### 2.3.2. Auswertung

Die Auswertung kann nicht über eine einfache Eichgerade erfolgen, die Meßwerte lassen sich aber gut über ein Polynom 2. Grades ( Parabel ) ausgleichen ( Abb.6 ).

Die wahrscheinlichsten Koeffizienten der Ausgleichsfunktion (7) ergeben sich aus der Lösung eines linearen Gleichungssystems, dessen Matrizendarstellung in (8) wiedergegeben ist.

$$c_i = a_0 + a_1 F_i + a_2 F_i^2 \quad (7)$$

$$\begin{bmatrix} a_0 n & a_1 \sum F & a_2 \sum F^2 \\ a_0 \sum F & a_1 \sum F^2 & a_2 \sum F^3 \\ a_0 \sum F^2 & a_1 \sum F^3 & a_2 \sum F^4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum c \\ \sum cF \\ \sum cF^2 \end{bmatrix} \quad (8)$$

$(i = 1, 2, 3 \dots n)$

Der Übersichtlichkeit halber sind alle Indizes weggelassen.

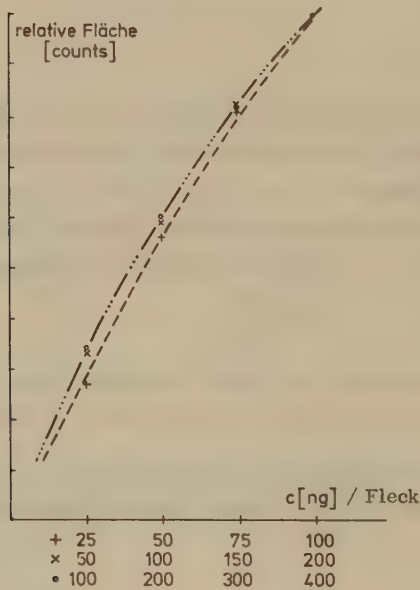


Abb. 6

### 2.3.3. Ergebnisse

Wir führten die Untersuchungen in verschiedenen Konzentrationsbereichen durch, um den Polynomausgleich zu testen:

10 bis 40, 25 bis 100, 50 bis 200, sowie 100 bis 400 ng pro Fleck.

Niedrigere Konzentrationen ( 2 bis 10 ng ) sind nur noch mit verringerter Genauigkeit erfassbar ( Tab. 26). Bei Verwendung von handelsüblichem Thiabendazol ( Verunreinigungen haben wiederum keinen Einfluß auf die relativen Ergebnisse ) wurden mit dem hier beschriebenen Verfahren die aus Tabelle 8 ersichtlichen Ergebnisse erzielt. Die im Bereich von 50 bis 200 ng auftretenden Abweichungen aus Einzelmessungen sollen noch einmal zahlenmäßig die Richtigkeit der parabolischen Ausgleichsrechnung belegen.

Tabelle 8

| aufgetragene Substanzmenge<br>( ng ) | gefundene Substanzmenge<br>( ng ) | Abweichung |       |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------|-------|
|                                      |                                   | ( ng )     | ( % ) |
| 50                                   | 49,9                              | - 0,1      | - 0,2 |
|                                      | 48,5                              | - 1,5      | - 3,0 |
|                                      | 50,7                              | + 0,7      | + 1,4 |
|                                      | 51,3                              | + 1,3      | + 2,6 |
|                                      | 49,9                              | - 0,1      | - 0,2 |
| 100                                  | 99,4                              | - 0,6      | - 0,6 |
|                                      | 99,8                              | - 0,2      | - 0,2 |
|                                      | 98,0                              | - 2,0      | - 2,0 |
|                                      | 99,6                              | - 0,4      | - 0,4 |
|                                      | 96,8                              | - 3,2      | - 3,2 |
| 150                                  | 150,7                             | + 0,7      | + 0,5 |
|                                      | 149,7                             | - 0,3      | - 0,2 |
|                                      | 151,5                             | + 1,5      | + 1,0 |
|                                      | 151,1                             | + 1,1      | + 0,7 |
|                                      | 148,0                             | - 2,0      | - 1,3 |
| 200                                  | 198,6                             | - 1,4      | - 0,7 |
|                                      | 200,9                             | + 0,9      | + 0,5 |
|                                      | 198,5                             | - 1,5      | - 0,8 |
|                                      | 199,0                             | - 1,0      | - 0,5 |
|                                      | 197,5                             | - 2,5      | - 1,3 |

Die genäherte relative Standardabweichung liegt in diesem Fall für 20 Kontrollflecke auf 5 DC-Platten bei 1,4%. Ähnlich sind auch die Ergebnisse in den anderen Konzentrationsbereichen.

### 3. Mehrkomponenten

Bei entsprechender Optimierungstechnik können nicht nur chemisch sehr ähnliche Substanzpaare, sondern auch Vielkomponentengemische mit großer Polaritätsspanne auf ein und derselben DC-Platte qualitativ getrennt werden. Dabei stellen die Entwicklung von einer Substanz oder die Auftrennung von Vielkomponentensystemen praktisch einen Arbeitsgang dar. Die Simultanbestimmung von Mehrstoffgemischen und ihre on line - Auswertung sollen Gegenstand der folgenden Betrachtungen sein.

#### 3.1. Mehrkomponentenanalysen über Eichgeraden

Bei Einkomponentenanalysen konnte dem Basislinienversatz durch Vor- und Rückscan relativ gut begegnet werden. Scannt man jedoch mehrere Flecken pro Bahn, ergeben sich durch Einflüsse vom Untergrund her Integrationsfehler. Das kann sogar dazu führen, daß der Integrator aus dem Nachziehbereich der Basislinie gerät und das Peakende nicht mehr erkennt. Ein nach dem Zweistrahlprinzip arbeitendes Densitometer kann hier Abhilfe schaffen, wie das Beispiel in Abb. 7 zeigt.

Das Zweistrahlprinzip erweist sich in Verbindung mit einem Integrator als das geeignetere Meßsystem. Außer der Basisliniendrift werden Unregelmäßigkeiten in der Schichtdicke des Chromatogramms ausgeglichen. Der Einwand, daß die Kompensation auf einer Vergleichsbahn - zwar in enger Nachbarschaft - aber doch nicht direkt auf der Fleckbahn stattfindet, ist bei Verwendung von Fertigplatten wenig schlagkräftig, wenn man bedenkt, daß hierdurch immer vorhandene Verunreinigungen des Sorbens, Schwankungen der Lichtquelle und des Photomultipliers zusätzlich eliminiert werden können.

In den folgenden Untersuchungen wurde das SCHOEFFEL SD 3000 Densitometer eingesetzt. Man kann es prinzipiell wie das ZEISS-Gerät mit der Integrator / Rechner - Kombination koppeln. Eine externe Signalwandlung für Remissionsmessungen ist im Zweistrahlverfahren nicht notwendig. Für andere Meßanordnungen besteht Umschaltmöglichkeit am Anzeigegerät. Als zweckdienlich erweist es sich, einen schnellen Schreiber zur optischen Fleckpositionierung parallel zu schalten.

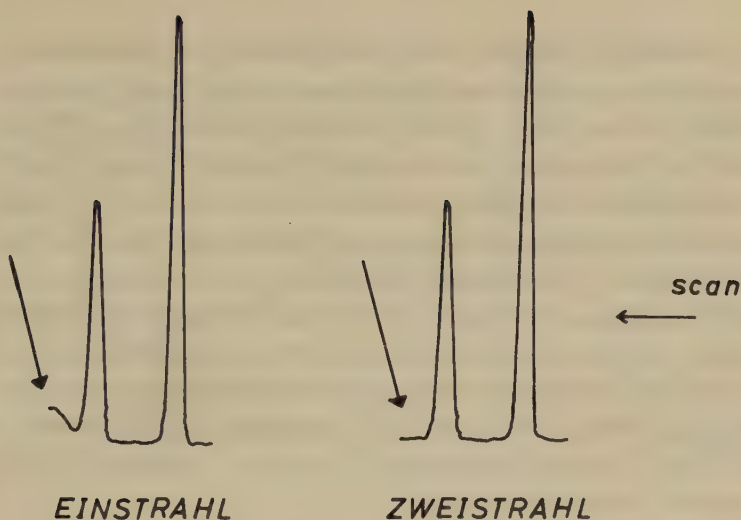


Abb. 7: Aminophenazon ( jeweils linker Peak ) und Phenazon  
Fließmittel: Aceton, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Dioxan,  
4 : 3 : 2 : 1 v/v.

### 3.1.1. Zweikomponenten (53)

Die quantitative Bestimmung von zwei Substanzen auf einer Platte ergibt in der Praxis eine Reihe zusätzlicher Probleme. Man kann zwar ohne größere Schwierigkeiten zwei Homologe nebeneinander bestimmen, in der Analytik typischer Analgetikagemische wird jedoch die Auswertung insofern komplizierter, als Substanzen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima und variierenden Konzentrationen vorliegen. Am Beispiel der Bestimmung von Phenacetin und Coffein soll das Verfahren erläutert werden.

### 3.1.2. Bestimmung von Phenacetin und Coffein

Beide Substanzen werden üblicherweise im Mengenverhältnis 4 : 1 pro anzuwendender Dosis in Analgetikagemischen pharmazeutisch verwendet. Die Absorptionsmaxima liegen bei Remissionsmessungen auf Kieselgel bei 250 nm ( Phenacetin ) und 275 nm ( Coffein ).

Eine Betrachtung der Spektren ( Abb.8 ) macht deutlich, daß im vorliegenden Konzentrationsverhältnis bei keiner Wellenlänge eine gleichgroße Remissionsminderung zu erwarten ist. Es wurde schließlich im Maximum des Coffeins gemessen, weil diese Substanz in der geringeren Konzentration vorliegt, somit auf der langwelligen Flanke des Phenacetinspektrums. Prinzipiell ist das Messen auf der Flanke problematisch, da geringe Änderungen der Meßwellenlänge bereits beachtliche Fehler nach sich ziehen können, die umso größer sind, je steiler der Abfall der Flanke erfolgt. Im vorliegenden Fall ist zu erwarten, daß der durch diese Meßbedingung resultierende Fehler in annehmbaren Grenzen bleibt: Die jeder Komponente zugrunde liegende Eichgerade wird in demselben Arbeitsgang bestimmt wie die eigentliche Analysenauswertung. Während der gesamten Messung bleibt die Meßwellenlänge unverändert. Darüber hinaus ist das eingestrahlte Licht relativ breitbandig.

### 3.1.3. Auswertebedingung

Die bisher bei der Remission eingesetzte empirische Beziehung  $c \sim F^2$  hat allgemein im unteren Mikrogrammbereich innerhalb einer Zehnerpotenz Gültigkeit. Schränkt man den Konzentrationsbereich z.B. auf eine  $\pm 10\%$  - Messung ein, besteht linearer Zusammenhang zwischen Meßwert und Substanzmenge (2). Im Hinblick auf die Anwendung eines solchen Verfahrens in der Analytik der Qualitätskontrolle, bei der die Abweichung vom vorgegebenen Sollwert die einzig interessierende Größe ist, wird ein Auftrageschema verwendet, das den Sollwert ( $c = 1$ ) und die obere bzw. untere Toleranzgrenze ( $c = 1.1$  und  $c = 0.9$ ) umfaßt ( Tab.9 ). Es sorgt dafür, daß auf Grund der gewählten Reihenfolge Plattengradienten in die Eichgerade miteingehen. Zudem läßt sich die Ausgleichsrechnung nach der Methode der Fehlerquadrate vereinfachen. Unter Voraussetzung der oben angegebenen Eichkonzentrationen und des Auftrageschemas stellen  $n$ ,  $c_i$  und  $c_i^2$  konstante Größen dar und haben folgende numerischen Werte:

$$\sum c_i = 6$$

$$\sum c_i^2 = 6.04$$

$$n = 6$$

Hierdurch vereinfachen sich die Gleichungen (9) zu (10) und (12) zu (13):

$$m = \frac{\sum c_i \sum F_i - n \sum c_i F_i}{(\sum c_i)^2 - n \sum c_i^2} \quad (9)$$

$$\downarrow$$

$$= \frac{\sum c_i F_i - \sum F_i}{0.04} \quad (10)$$

$$\downarrow$$

$$= \frac{1}{\alpha} (\sum c_i F_i - \sum F_i) \quad (11)$$

$$b = \frac{1}{n} (\sum F_i - m \sum c_i) \quad (12)$$

$$\downarrow$$

$$= \frac{1}{n} \sum F_i - m \quad (13)$$

Tabelle 9: Auftrageschema und Auswerteparameter.

A = Analysenbahn; Zahlenangaben: rel. Konzentrationen zum Sollwert.

| Auftrageschema (1 - 4)  | n | $\sum c_i$ | $\sum c_i^2$ | $\alpha$ |
|-------------------------|---|------------|--------------|----------|
| 1.1 1.1 1 A A 1 0.9 0.9 | 6 | 6          | 6.04         | 0.04     |
| 1.2 1.2 1 A A 1 0.8 0.8 | 6 | 6          | 6.12         | 0.12     |
| 1.1 A 1 A A 1 A 0.9     | 4 | 4          | 4.02         | 0.02     |
| 1.2 A 1 A A 1 A 0.8     | 4 | 4          | 4.06         | 0.06     |

Ein Wechsel des Auftrageschemas ändert lediglich den numerischen Wert  $\alpha$  in der allgemeinen Gleichung (11), während Gleichung (13) ihre Gültigkeit behält (Tab.9).

### 3.1.4. Ergebnisse

Auf insgesamt 9 Platten wurden 18 Analysen von Phenacetin und Coffein durchgeführt. Der Sollwert ( = 100 %) lag bei 1  $\mu$ g Phenacetin bzw. 0.25  $\mu$ g Coffein. Darüber hinaus wurden eine gleiche Zahl von Platten nach dem Auftrageschema 3 ausgewertet, wobei jeweils 4 Analysen pro Platte aufgetragen werden konnten. Nach beiden Verfahren ergeben sich genäherte relative Standardabweichungen ohne signifikante Unterschiede ( Tab.10 ).

Tabelle 10

| Substanz   | Auftrageschema 1<br>n = 18 | Auftrageschema 3<br>n = 36 |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| Phenacetin | 1.51 %                     | 1.50 %                     |
| Coffein    | 2.56 %                     | 2.64 %                     |

### 3.2.1. Dreikomponenten

### 3.2.2. Bestimmung von Acetylsalicylsäure, Phenacetin und Coffein

In Erweiterung des Zweikomponentensystems wurde diese Kombination gewählt, weil sie pharmazeutisch relevant ist und erstmals Tabletten in die Untersuchungen miteinbezogen werden sollten. Tabelle 11 enthält die für die Analyse wichtigen Daten:

Tabelle 11

| Substanz           | mg/Dosis | UV-Absorption |
|--------------------|----------|---------------|
| Acetylsalicylsäure | 250      | 300           |
| Phenacetin         | 200      | 250           |
| Coffein            | 50       | 275           |

Hinsichtlich der auszuwählenden Meßwellenlänge für die Remissionsauswertung liegt hier ein Modellfall vor ( Abb.8 ).

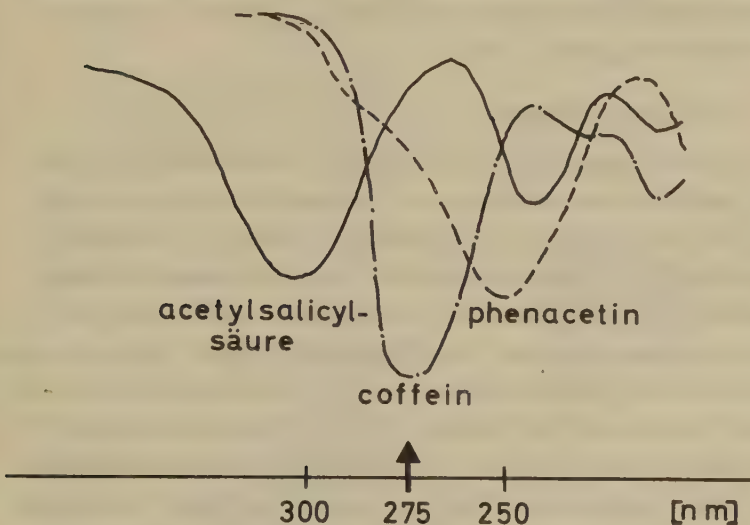


Abb.8: Konzentrationsverhältnis 1 : 1 : 1

275 nm sind nicht nur deshalb geeignet, weil dadurch die am niedrigsten dosierte Komponente im Maximum gemessen wird, sondern diese Wellenlänge liegt auch ideal zwischen den beiden anderen, stärker dosierten Substanzen auf deren ab- oder aufsteigender Flanke. Trotz variierender Konzentrationen und Extinktionskoeffizienten resultieren Ortskurven mit Integralen gleicher Größenordnung. Man muß hier anmerken, daß die freizügige Wahl der Meßwellenlänge ohne wesentlichen Intensitätsverlust nur bei Linien-Kontinuum-Kombinationsstrahlern möglich ist ( z.B. Hg/Xe ). Das unruhige Brennverhalten des Lampenbogens wirkt sich im Zweistrahlbetrieb nicht negativ aus. Deuteriumlampen setzten wir aus Gründen des ungünstigeren Signal / Rauschverhältnisses weniger ein.

### 3.2.3. Rechenprogramm

Auf Grund der mathematischen Vereinfachung im eingeschränkten Konzentrationsbereich ( 3.1.3. ) ist es möglich, drei Eichgeraden auf einem Hundertspeicherplatzrechner bei externer Programm- und Dateneingabe zu berechnen. Wesentliches Element bei der Programmierung bildet die Adressenmodifikation. Mit ihrer Hilfe kann man Konstantenspeicher nach sukzessiver Zifferncodeänderung zur Eingabe der verschiedenen Fleckflächen mehrfach benutzen. Ausschnittweise ist das Steuerschema für die DIEHL COMBITRON S am Beispiel der Erfassung einer Eichbahn wiedergegeben ( Abb.9 ).

### 3.2.4. Chromatographiebedingungen

Die in situ-Remissionsmessung im eingeschränkten Konzentrationsbereich stellt höchste Ansprüche an die Chromatogramme. Grundsätzlich sollte man Fertigplatten vor der Verwendung auf absorbierende Verunreinigungen und Schichtbeschädigungen prüfen. Bezüglich des Einflusses von Schichtdickenschwankungen und Beschichtungsrichtung führten wir in Zusammenarbeit mit dem Hersteller, der uns die Streichrichtung angab, folgende Untersuchung durch: Jede Platte wurde vor und nach der Entwicklung mit Aceton, in und quer zur Streichrichtung, jeweils im Abstand von 5 cm, nach dem Einstrahl- und Zweistrahilverfahren gescannt. Das Ergebnis ist in Abb.10 ( s.S. 30 ) wiedergegeben. Bei der Einstrahlmessung quer zur Beschichtungsrichtung läßt sich eindeutig ein Basislinientrend ermitteln. Nach der Entwicklung kommt es zusätzlich zur Ausbildung einer Lösungsmittelfront.

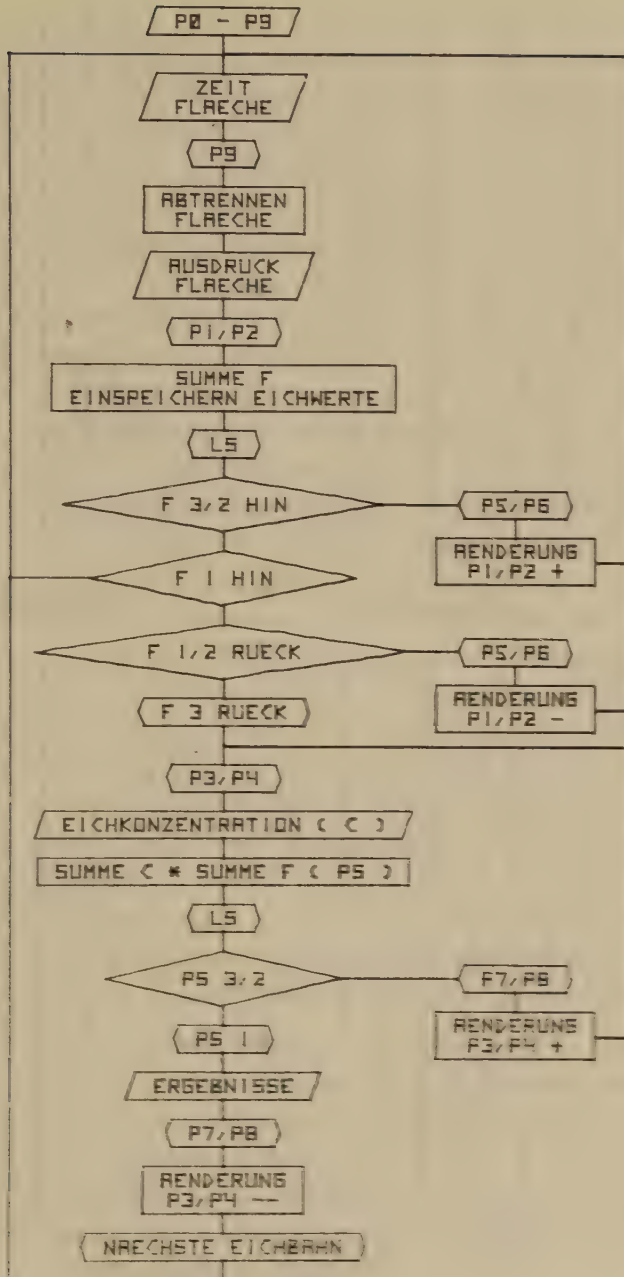


Abb. 9: Fließschema: 3 Komponenten über 3 Eichgeraden.

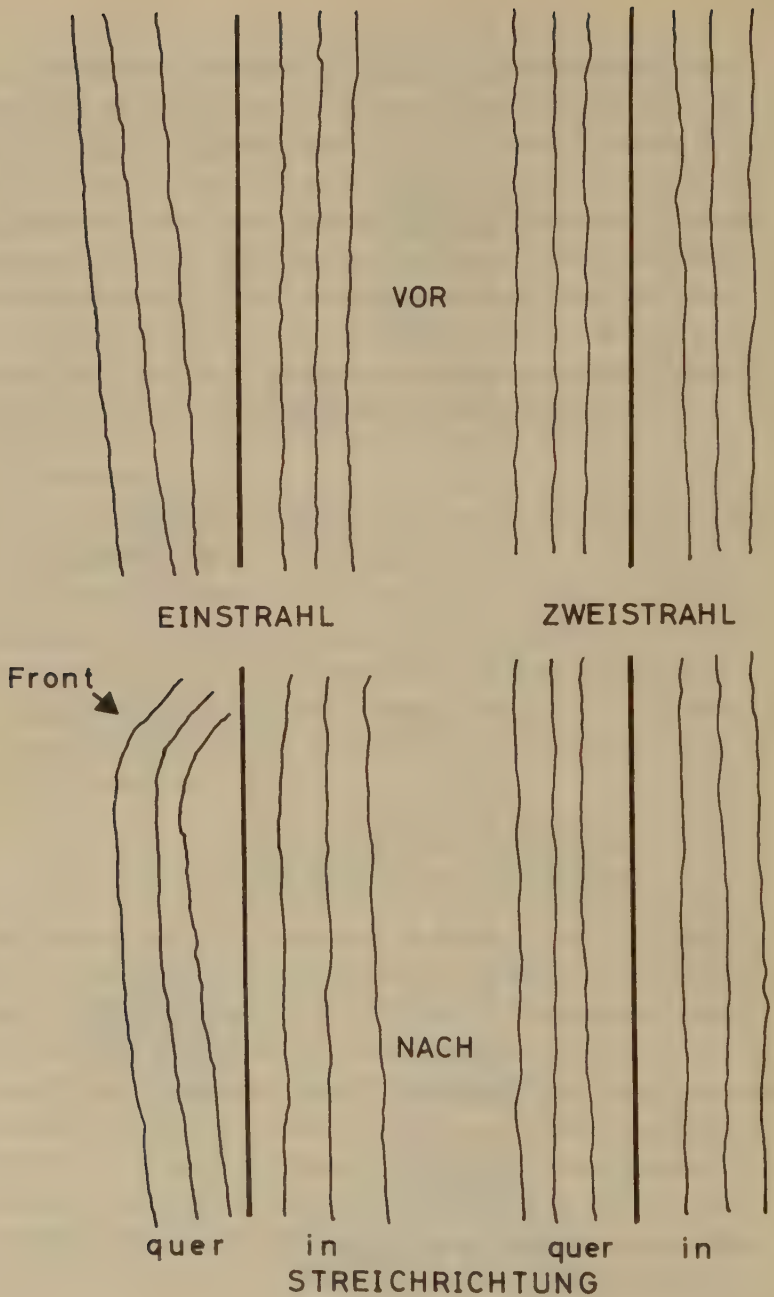


Abb.10:  $\lambda$ : 270nm, Kieselgel 60, Fertigplatten MERCK; Auswertung von 10 Platten in Remission.

Bringt man in Anrechnung, daß die Entwicklung mit p.a. Aceton durchgeführt wurde, so ist festzustellen, daß die Untergrundabsorption durch Verunreinigungen des Sorbens verursacht wird. Von dieser Tatsache muß man bei der quantitativen DC-Auswertung ausgehen. Hier zeigt sich wiederum die Überlegenheit der Kompensationsmöglichkeit im Zweistrahlbetrieb, prinzipiell natürlich auch nach dem Zweiwellenlängenverfahren ( s. Kap. 10.4 ). Sowohl Front als auch die Streichrichtung haben keinen Einfluß auf das Meßergebnis, was wir auch an Hand von entsprechend durchgeführten Versuchen mit Substanzen nachweisen konnten.

Bei der Zusammenstellung der Fließmittel gingen wir allgemein von p.a. Qualität aus. Die Trennung der einzelnen Komponenten muß so erfolgen, daß jeder Fleck vom anderen soweit separiert ist, daß bei der elektronischen Integration eine eindeutige Basislinienerkennung erfolgen kann. Andererseits sollen die Fleckzonen möglichst eng beieinander liegen, um unnötig lange Scan-Zeiten zu vermeiden. Der Fleck mit dem niedrigsten Rf-Wert muß mindestens soweit gelaufen sein, daß die typische Substanzverteilung auf Grund der chromatographischen Entwicklung durch Adsorptions- und Verteilungskräfte eintritt. Bei Rf-Werten unter 0.2 konnten wir feststellen, daß die Fleckzonen überwiegend durch die Auftragform geprägt sind. Im Falle von Fließmittelgemischen wurden bevorzugt Lösungsmittel mit ähnlichem Dampfdruck ausgewählt. Durch ihren Einsatz kann man verhindern, daß beim Öffnen der N-Kammer (32) die niedriger siedende Flüssigkeit vorzeitig verdunstet. Man kann jedoch nicht erreichen, daß die Fließmittelzusammensetzung während des Trennprozesses konstant bleibt, da die mobile Phase zunehmend an polarer Komponente verarmt. Hierbei können sich  $\beta$ -Fronten ausbilden, die an der ovalen, langgestreckten Fleckform zu erkennen sind. In solchen Fällen sollte man von einer quantitativen Auswertung absehen. Fließmittelgemische wurden bei unseren Arbeiten in 50-70 ml-Mengen nur zu ein bis zwei Entwicklungen verwendet.

Bei Schwankungen der Zusammensetzung des Gasraumes in der N-Kammer durch Temperaturänderungen von außen, durch die Adsorptionswärme der Fließmittelfront, verbunden mit Änderungen der relativen Feuchtigkeit im Trennsystem und unterschiedlichen Diffusionen durch variierende Viskositäten, kommt es zur Ausbildung von Gradienten senkrecht zur Entwicklungsrichtung, somit auch zu Fleckdeformationen, die eine Verschlechterung des Analyseergebnisses nach sich ziehen.

Diesen Einflüssen konnten wir wirksam durch Konstruktion und Einsatz von thermostatizierbaren Entwicklungskammern begegnen. Diese wurden bei 20° gesättigt. Es ist darauf zu achten, daß zur U-förmigen Auskleidung verwendetes Filtrierpapier ohne Falten an der Glaswand haftet. Nur so ist ein gleichmäßiges Abdunsten des Fließmittels gewährleistet. Versuche, das Filtrierpapier durch Frittenglas oder großporige Keramikplatten zu ersetzen, scheiterten an deren ungenügenden Kapillarkräften oder an der problematischen Reinigung.

Es wird berichtet (54), daß es vorteilhaft sei, vor der Entwicklung eine Konditionierung der DC-Platten bei 4° durchzuführen. Eine dadurch zu erzielende gleichmäßige Sättigung der stationären Phase und eine homogene Fleckverteilung konnten wir nicht bestätigen. Vorteilhaft erschien uns allerdings die Berücksichtigung der Kammergeometrie. Wir entwickelten jeweils nur eine Platte in senkrechter Stellung. Als Halterung diente hierbei die DESAGA-KS-Rillenklammer. Die Schräglage der Platten kann auf Grund unterschiedlicher sorptiver Belegung einen konvexen oder konkaven Frontverlauf des Fließmittels verursachen.

### 3.2.5. Tablettenanalyse

Bezugnehmend auf die GOOD MANUFACTURING PRACTICES (GMP) kommt es bei einzeldosierten Arzneiformen darauf an, daß die Wirkstoffe über eine Charge homogen verteilt sind. Im Rahmen einer Qualitätskontrolle muß folglich auf Schwankungen des Gehaltes durch Einzelprobenanalysen geprüft werden. Während einige Pharmakopöen den Wirkstoffgehalt an einem homogenisierten Mischmuster aus 10-20 Einzelformen bestimmen lassen, verlangt die USP XVIII in bestimmten Fällen den CONTENT UNIFORMITY TEST (CUT), die Überprüfung der Einzeldosierung in Tabletten, Dragees, Kapseln und Trockenampullen, sofern der Wirkstoffanteil  $\leq 50$  mg / Arzneiform beträgt. Von zehn untersuchten Einzelformen dürfen neun bis  $\pm 15$  %, eine bis  $\pm 25$  % vom deklarierten Sollwert abweichen (55).

Bei der Simultanbestimmung von Kombinationspräparaten ist der in situ-Messung Vorrang einzuräumen gegenüber Methoden, die mit zeitaufwendigen Extraktionsschritten zur Isolierung und Bestimmung der Einzelsubstanzen eine Fehlerfortpflanzung bedingen. Bei der Vorbereitung der Tablettenanalyse wird nicht anders verfahren als bei der Herstellung der entsprechenden Vergleichslösungen.

Galenische Hilfsstoffe stören weder das Auffüllen der Meßlösung noch das Auftragen auf die Dünnschichtplatte, meistens auch nicht den Trennprozeß oder die Messung. Gerade hier liegt ein Nachteil der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), nämlich das unkontrollierbare Verhalten der Hilfsstoffe auf der Trennsäule, was zu Änderungen der Packungsdichte und zu langsamem Durchdringen löslicher organischer Bestandteile führen kann. Auch die geringe Flexibilität der HPLC sollte erwähnt werden, das Umstellen von einer Analyse auf eine andere mit Säulen- und Fließmittelwechsel. Hier ist ein Zeitfaktor von zwei Stunden bis zur Konstanz des Systems anzusetzen.

### 3.2.6. Ergebnisse

Bei der Dreikomponentenanalyse über drei Eichgeraden ergeben sich für die Methode genäherte relative Standardabweichungen (  $n = 20$  ) von 1.95 % für Acetylsalicylsäure, 2.13 % für Phenacetin und 3.00 % für Coffein. Tabelle 12 enthält die Einzelauswertungen des entsprechenden Handelspräparates THOMAPYRIN. Die Spezialität erfüllt die Anforderungen der CONTENT UNIFORMITY. Neben authentischen Substanzen standen uns Tablettenchargen mit Untersuchungsprotokollen des Herstellers zur Verfügung. Gegenüber diesen ergaben sich keine signifikanten Abweichungen.

Tabelle 12: Tablettenanalyse nach CUT

| Acetylsalicylsäure<br>dekl. Geh.: 250 mg |        | Phenacetin<br>200 mg |        | Coffein<br>50 mg |        |
|------------------------------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| gefunden :                               |        |                      |        |                  |        |
| mg                                       | %      | mg                   | %      | mg               | %      |
| 253.93                                   | 101.57 | 181.68               | 90.84  | 49.61            | 99.21  |
| 243.50                                   | 97.40  | 190.98               | 95.49  | 54.79            | 109.57 |
| 240.93                                   | 96.37  | 189.08               | 94.54  | 49.02            | 98.04  |
| 261.73                                   | 104.69 | 190.78               | 95.39  | 46.41            | 92.81  |
| 238.05                                   | 95.22  | 207.86               | 103.93 | 48.62            | 97.24  |
| 255.98                                   | 102.39 | 204.14               | 102.07 | 54.15            | 108.30 |
| 241.48                                   | 96.59  | 190.80               | 95.40  | 51.16            | 102.31 |
| 255.35                                   | 102.14 | 201.50               | 100.75 | 51.83            | 103.65 |
| 243.43                                   | 97.37  | 194.86               | 97.43  | 49.64            | 99.27  |
| 224.05                                   | 89.62  | 199.70               | 99.85  | 49.28            | 98.56  |

#### 4. In situ-Fluorimetrie durch Zweipunkteichung (56)

##### 4.1. Übertragbarkeit von Eichfunktionen

Ein prinzipieller Nachteil der quantitativen DC liegt darin, daß für jede Platte eine individuelle Eichfunktion ermittelt werden muß. Es soll nun untersucht werden, inwieweit irgendwelche Korrelationen zwischen Meßparametern auf verschiedenen Platten möglich sind.

Am Beispiel der Bestimmung von Salicylsäure stellten wir zunächst die Eichbeziehung über vier Konzentrationen im Bereich von 50 bis 200 Nanogramm auf. Eine höhere Anzahl Meßpunkte in einem größeren Bereich bringt keinen signifikanten Gewinn an Präzision der Eichgeraden. Jede DC-Platte enthielt weiterhin vier Analysenflecken im gleichen Konzentrationsbereich. Zur Kontrolle des Gesamtfehlers und um statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können, wurden die Analysenflecken aus denselben Lösungen wie die Eichflecken aufgetragen. Tab. 13 enthält die Korrelationskoeffizienten und Steigungen der Regressionsgeraden von acht Platten.

Aus den unterschiedlichen Werten für die Steigungen folgt, daß die Übertragung einer Eichgeraden von einer Platte auf die andere, selbst bei der Verwendung von Fertigplatten gleicher Chargennummern, unter möglichst identischen Chromatographierbedingungen (thermostatisierte Kammern, gleiche Steighöhe des Fließmittels) und unter praktisch identischen Meßbedingungen (gleicher Abstand Platte - Meßkopf, unveränderte Spaltbreite, Spaltlänge, Verstärkung und Wellenlänge) mit einem Fehler von ca. 12 % behaftet ist.

Tabelle 13

| Platte | Korrelationskoeffizient <sup>+) </sup> | m                    |
|--------|----------------------------------------|----------------------|
| 1      | 0.99931                                | 2.416                |
| 2      | 0.99974                                | 2.583                |
| 3      | 0.99966                                | 2.250                |
| 4      | 0.99987                                | 2.391                |
| 5      | 0.99943                                | 2.676                |
| 6      | 0.99998                                | 2.068                |
| 7      | 0.99995                                | 2.250                |
| 8      | 0.99971                                | 1.308 <sup>++)</sup> |

<sup>+)</sup>  n = 4 ; c = 50, 100, 150, 200 ng/Fleck

<sup>++)</sup> abweichende Scangeschwindigkeit

#### 4.2. Zweipunkteichung

Zur Vereinfachung des Geradenausgleiches wurde von uns folgender Weg beschritten. Wir verwendeten die 150 ng Konzentration als Plattenstandard. Aus Abb.11 geht hervor, daß zwar eine recht gute Approximation der Meßdaten durch die Eichgeraden erfolgt, daß aber durch systematische Abweichungen der Eichflecken mit der niedrigsten Konzentration ein Fehler hervorgerufen wird. Wir wählten deshalb als zweiten Fixpunkt für die Festlegung der Eichgeraden die sich unter diesen Bedingungen ergebende "scheinbare Nachweisgrenze" von 15 ng, also den Abszissenwert.

ROEDER, EICH und MUTSCHLER (36) werteten bei der fluorimetrischen in situ-Messung ebenfalls mit Hilfe einer Zweipunkteichung aus. Die Autoren gingen jedoch davon aus, daß jede Eichgerade durch den Koordinatennullpunkt geht. Ein anderes Verfahren zur Festlegung eines Plattenstandards wurde von KLAUS (23) angegeben. Bei Verwendung der Fläche unter der Fluoreszenz-Ortskurve des 150 ng-Fleckes und der angenommenen Nachweisgrenze  $C_N$  von 15 ng ( experimentell  $15.1 \pm 2.1$  ) ergibt sich als Eichfunktion die Gleichung (14). Diese folgt unmittelbar aus der Zweipunkteformel für eine Gerade.

$$C_x = \frac{C_B - C_N}{F_B} (F_x - C_N) \quad (14)$$

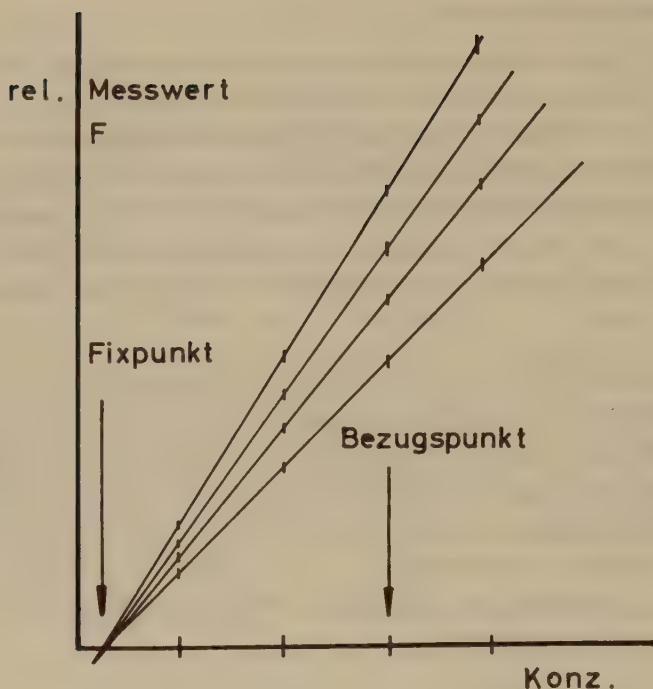


Abb. 11

#### 4.3. Vergleichende Auswertung

Tabelle 14 zeigt die Gegenüberstellung der drei Auswerteverfahren: Über eine Eichgerade aus vier Eichflecken, über die Zweipunktechung nach ROEDER, FICH und MUTSCHLER (36) und über das von uns modifizierte Verfahren. Die Ergebnisse sind unmittelbar miteinander vergleichbar, da sie auf Messungen derselben Platten, d.h. auf denselben Rohdaten basieren.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß durch die Auswertung über eine Eichfunktion auf jeder Platte die besten Ergebnisse erzielt werden ( $\sigma_{\text{rel}} = 1.3 \%$ ,  $n = 32$ ). Die Auswertung über die Zweipunktechung ergibt schlechtere Resultate (Verfahren ROEDER  $\sigma_{\text{rel}} = 3.41 \%$ ,  $n = 49$ , hier beschriebene Methode  $\sigma_{\text{rel}} = 2.12 \%$ ,  $n = 49$ ), doch steht dem ersten Verfahren hier der Vorteil höherer Analysenzahlen pro Platte gegenüber.

Tabelle 14

| Verfahren                                            | gegeben<br>ng | gefunden<br>ng | rel<br>% | bei<br>n = |
|------------------------------------------------------|---------------|----------------|----------|------------|
| Eichgerade                                           | 50            | 50.41          | 1.84     | 8          |
|                                                      | 100           | 97.73          | 1.14     | 8          |
|                                                      | 150           | 148.79         | 0.96     | 8          |
|                                                      | 200           | 199.29         | 1.35     | 8          |
| Zweipunkteichung<br>( ROEDER, EICH,<br>MUTSCHLER )   | 50            | 41.27          | 5.82     | 13         |
|                                                      | 100           | 93.81          | 3.07     | 14         |
|                                                      | 150           | 149.38         | 0.83     | 8          |
|                                                      | 200           | 205.17         | 1.41     | 14         |
| Zweipunkteichung<br>( hier beschriebene<br>Methode ) | 50            | 51.09          | 3.28     | 13         |
|                                                      | 100           | 98.36          | 1.86     | 14         |
|                                                      | 150           | 149.43         | 0.59     | 8          |
|                                                      | 200           | 201.16         | 1.72     | 14         |

Während bei der Auswertung über Eichgeraden nur vier Analysen ausführbar sind, können bei der Zweipunkteichung sieben Analysen auf einer Platte untergebracht werden.

## 5. Standardzumischmethode

Das Standardzumischverfahren wird in der Literatur für die quantitative DC mit graphischer Auswertung diskutiert (57). Bei der Durchführung setzt man der Analyse pro Komponente jeweils zwei bekannte und authentische Substanzmengen zu, wobei eine Eichbeziehung resultiert, die - am Beispiel einer Komponente - aus drei Meßpunkten und den zugehörigen Konzentrationen 0 (= Analyse),  $E_1$  und  $E_2$  besteht. Dadurch, daß man den Meßwert für die Analyse willkürlich bei  $c = 0$  ansetzt, resultiert ein negativer Abszissenschnittpunkt (A), der in seinem Absolutwert die gesuchte Konzentration darstellt. In Abb.12 ist zusätzlich (gepunktet) die Eichgerade eingezeichnet, die sich bei der Untersuchung der Methode aus drei definierten Einwaagen ergibt.

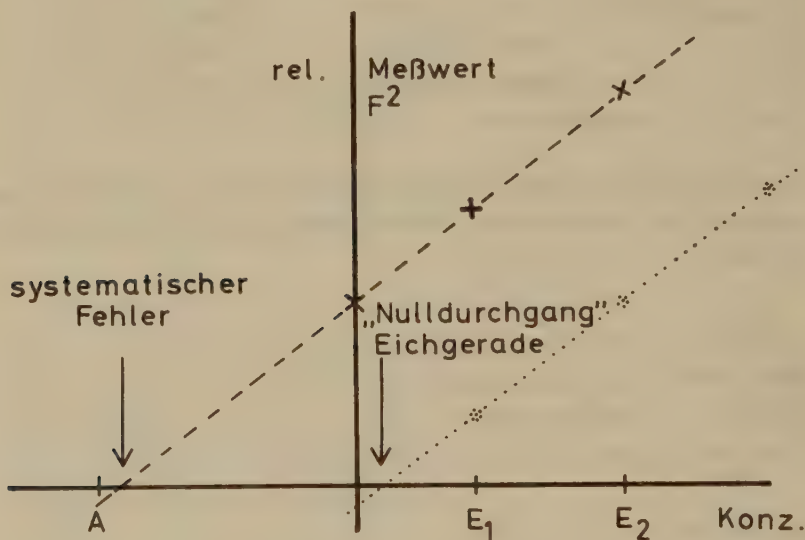


Abb. 12

Zwei Bedingungen werden als Voraussetzung angesehen:

- Zusatz authentischer Substanz
- Linearität von Meßwert und Konzentration.

Betrachtet man ein solches Verfahren für die Remission kritisch, kommt auch hier ( s. Kap. 4.2.) ein systematischer Fehler in Betracht. Was für die Fluorimetrie gilt, hat erst recht in der Remission Gültigkeit: Es muß eine "scheinbare Nachweisgrenze" geben, die in der zitierten Literaturstelle nicht berücksichtigt wird.

Um dies nachzuweisen, führten wir Remissionsmessungen mit Coffein unter Anwendung der Auswertefunktion  $c \propto F^2$  durch. Ausgehend von 0.5 µg/Fleck und unter zweimaliger Zuwaage von 0.25 µg wurden die Messungen im on line-Betrieb unter rechnerischer Extrapolation über die Regressionsgerade vorgenommen. Die gesuchte Konzentration wird an der Abszissennullstelle als Quotient aus Achsenabschnitt ( b ) und Steigung ( m ) ermittelt.

Erwartungsgemäß treten durch Nichtberücksichtigung der "scheinbaren Nachweisgrenze" für Coffein systematische Abweichungen auf. Abgesehen von einer Ausnahme sind alle Werte zu niedrig ( Tab.15 ). Bringt man jedoch den bei der Eichung ermittelten Abszissenulldurchgang in Anrechnung, der im Mittel 3.7 ng beträgt, kommt man zu Werten, die um die theoretische Einwaage streuen.

Die Standardabweichung eines solchen, vom systematischen Fehler befreiten Zuzusatzverfahrens liegt nur bei 5 %. Hinsichtlich Genauigkeit und Analysenzahl - 3 pro Platte - kommt es für die Densimetrie weniger in Betracht.

Tabelle 15

| gefunden<br>µg       | korr. Ergebnis<br>µg |
|----------------------|----------------------|
| 0.443                | 0.481                |
| 0.528 *              | 0.565 *              |
| 0.476                | 0.514                |
| 0.441                | 0.479                |
| 0.454                | 0.492                |
| 0.498                | 0.536                |
| 0.434                | 0.472                |
| 0.427                | 0.465                |
| 0.482                | 0.520                |
| 0.463                | 0.501                |
| 0.475                | 0.513                |
| 0.483                | 0.521                |
| $\bar{x}$ : 0.461    | $\bar{x}$ : 0.499    |
| $\sigma_{rel}$ : 5.0 | $\sigma_{rel}$ : 4.6 |

## 6. Auswertung mit internem Standard ( 58 )

### 6.1. Bestimmung von Coffein durch in situ-Remission

Im folgenden soll die Auswertung mit Hilfe eines internen Standards diskutiert werden. In der Gaschromatographie ist diese Methode längst Allgemeingut geworden. Es ist deshalb verwunderlich, daß dieses Verfahren in der quantitativen DC praktisch nicht eingesetzt wird. Lediglich KLAUS untersuchte mit Hilfe eines Standards die Übertragbarkeit von Eichfunktionen auf verschiedene Platten und schlug ferner vor, in einem Substanzgemisch nach der Trennung eine Nebenkomponeute zur quantitativen Auftragekontrolle zu benutzen ( 57 ).

#### 6.1.1. Methode

Eine genauere Diskussion erübrigt sich, da die Methode in allen Lehrbüchern der Gaschromatographie ausführlich beschrieben ist, z.B. ( 59 ). Auf einer Vergleichsbahn wird aus den bekannten Substanzmengen des Standards und der bekannten Konzentration einer zu bestimmenden Substanz ein Eichfaktor ermittelt (Gl.15, 15a) mit dessen Hilfe bei gleicher Standardmenge auf der Analysenbahn die unbekannte Konzentration der zu bestimmenden Substanz berechnet wird (Gl.16).

$$f = \frac{C_{X, Eich}}{C_{St, Eich}} \cdot \frac{F_{St, Eich}}{F_{X, Eich}} \quad (15)$$

$$f' = f \cdot C_{St, Eich} = C_{X, Eich} \cdot \frac{F_{St, Eich}}{F_{X, Eich}} \quad (15a)$$

$$C_{X, Anal} = f' \cdot \frac{F_{X, Anal}}{F_{St, Anal}} \quad (16)$$

Es empfiehlt sich, auf jeder Dünnschichtplatte zwei Eichbahnen mitzuchromatographieren. Es bleibt dann noch Platz für sechs Analysenbahnen. Prinzipiell können aber Probe und Vergleich auch alternieren ( Abb.13 ).

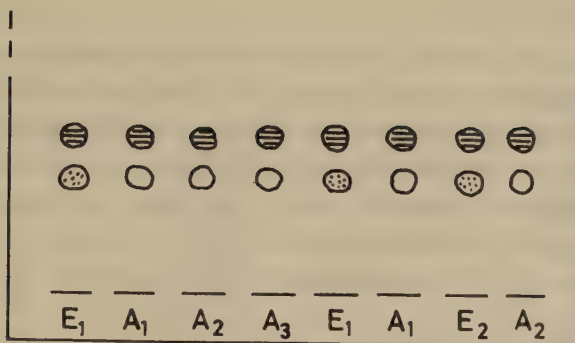


Abb.13

#### 6.1.2. Auswahl der Standardsubstanz

Hierbei müssen verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- Die Rf-Werte von Probe bzw. Vergleich und Standard sollen bei guter Auflösung nicht zu sehr differieren.
- Die Absorptionsmaxima müssen ähnlich sein.
- Die Konzentrationen sollen so gewählt werden, daß die Remissions-Ortskurven ähnliche Größenordnung haben.

Tab.16 enthält die für die Coffein-Bestimmung vorgegebenen bzw. gewählten Daten.

Tabelle 16

| Substanz                 | Konzentration | Absorptions-<br>maximum | Rf-Wert |
|--------------------------|---------------|-------------------------|---------|
| Coffein                  | 1.6 $\mu$ g   | 275 nm                  | 0.38    |
| Standard<br>(Phenacetin) | 2.0 $\mu$ g   | 250 nm                  | 0.56    |

### 6.1.3. Reproduzierbarkeit

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurden zunächst auf einer Reihe von Platten acht Substanzgemische Coffein/Phenacetin derselben Zusammensetzung aufgetragen, chromatographiert und jeweils die Eichfaktoren nach Gleichung (15a) ermittelt. Das jeweilige Verhältnis der integrierten Remissionsgrad-Ortskurven von Substanz zu internem Standard ist in Tab.17 eingetragen. Aus diesem Zahlenmaterial wird deutlich, daß die Eichfaktoren um etwa 5 % differieren und zur Übertragung von Platte zu Platte erwartungsgemäß nicht geeignet sind ( s. Kap. 4.1.).

### 6.1.4. Ergebnisse

Durch die on line-Kopplung des Rechners ist es wiederum möglich, ohne Zeitverlust den Mittelwert der integrierten Remissionsgrad-Ortskurve aus einem Scan in und gegen die Entwicklungsrichtung des Chromatogramms zu bilden. Im für den Routinebetrieb einer Qualitätskontrolle in Frage kommenden Konzentrationsbereich kann man ohne wesentlichen Fehler einen linearen Zusammenhang zwischen der ermittelten Fläche und der Konzentration im DC-Fleck annehmen.

Wir testeten die Methode am Beispiel der Analyse von Coffein unter Verwendung von Phenacetin als internem Standard aus. Wiedergefunden wurden im Mittel 100.45 % bei einer genäherten relativen Standardabweichung von 1.36 % ( n = 20 ). Die Bestimmung von Coffein in Tabletten ( MBK COMPRETEN 0.2, MERCK ) ergab nach Umrechnung auf Coffeinmonohydrat 206 mg/Tablette,  $\sigma_{\text{rel}} = 2.4 \%$  ( n = 27 ).

Tabelle 17

| Platte | f                                                                            | $\sigma_{\text{rel}} (n = 8)$ |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1      | 0.5930<br>0.5842<br>0.5905<br>0.5904<br>0.5900<br>0.5878<br>0.5970<br>0.5903 | 0.5904<br>0.63 %              |
| 2      | 0.6974<br>0.5843<br>0.5923<br>0.6041<br>0.6118<br>0.6072<br>0.6092<br>0.6100 | 0.6020<br>1.68 %              |
| 3      | 0.7060<br>0.7129<br>0.6917<br>0.6879<br>0.6816<br>0.6797<br>0.6812<br>0.6817 | 0.6916<br>1.75 %              |
| 4      | 0.4834<br>0.4831<br>0.4762<br>0.4799<br>0.4773<br>0.4794<br>0.4821<br>0.4725 | 0.4792<br>0.79 %              |
| 5      | 0.4579<br>0.4465<br>0.4472<br>0.4510<br>0.4392<br>0.4384<br>0.4401<br>0.4360 | 0.4445<br>1.68 %              |

## 6.2. Bestimmung von Acetylsalicylsäure durch in situ-Fluoreszenz (60)

Die optischen Eigenschaften setzen hier voraus, daß Standard und Analysensubstanz über ähnliche Exzitations- und Emissionseigenschaften verfügen müssen. Acetylsalicylsäure wird nach der DC-Entwicklung thermisch in freie Salicylsäure überführt. Tab. 18 enthält die fluorimetrischen Daten. Zur Simultanbestimmung eignet sich die Standardsubstanz Anthranilsäure.

Tabelle 18

| Substanz           | Exzitation | Emission    | Meßwellenlänge |
|--------------------|------------|-------------|----------------|
| Acetylsalicylsäure | 310 nm     | 400 nm      | 300            |
| Anthranilsäure     | 335 nm     | 422 nm (61) | 420            |

An Hand dieser Bestimmung konnten wir zeigen, daß fluorimetrische Analysen auch im ungesättigten Kammersystem mit hoher Präzision möglich sind. Der Fehler der Methode liegt bei 1.1 % ( n = 16 ). Dieses Ergebnis findet seine Erklärung in folgenden Punkten:

- Wegfall des Auftragefehlers durch den internen Standard
- die genauere fluorimetrische Messung, da weitgehendst Unabhängigkeit von der Form der DC-Flecken besteht
- alternierende Auswertung von Probe und Vergleich auf engstem Raum schaltet den im ungesättigten System verstärkt auftretenden Fließmittelgradienten aus.

Bei der Analyse von ASPIRIN-Tabletten 0.5 g ergab sich ein mittlerer Gehalt von 503.8 mg bei einer relativen Standardabweichung ( n = 46 ) von 2.4 %.

### 6.3. Zweikomponentenanalyse

#### 6.3.1. Acetylsalicylsäure und Coffein im Verhältnis 10 : 1

Ausgehend von der Tablettenspezialität CAFASPIN sollte geprüft werden, wie genau die Komponenten einer Arzneimittelmischung simultan durch in situ-Analyse bestimmbar sind, wenn extremere Konzentrationsunterschiede herrschen. Wir konnten feststellen, daß die Remissionsanalyse im UV bei einem Verhältnis von 10 : 1 der zu bestimmenden Substanzen mit einer Wellenlänge noch gut möglich ist, wenn die Absorptionsmaxima - im hier gewählten Beispiel unter Zusatz des Standards Phenacetin - genügend unterschiedlich sind, jedoch eine Differenz von ca. 50 nm im mittleren UV-Bereich nicht überschreiten. Da die Einwaage des Standards variiert werden kann, mißt man auch in diesem Fall im Maximum der schwächer dosierten und somit auf der Flanke der stärker dosierten Komponente. So erreicht man die notwendige Nivellierung der Remissionssignale.

Hierbei wurde auch die Möglichkeit einer automatischen Wellenlängenumschaltung während des Scanbetriebes diskutiert. Abgesehen von der Nichtlinearität der Wellenlängenskala und vom technischen Aufwand, sind verschiedene Nachteile nicht zu übersehen: Jede Wellenlänge verursacht eine spezifische Streuung auf dem opaken Untergrund des Kieselgels. Bei großen Wellenlängendifferenzen - und nur dort wäre die Umschaltung sinnvoll - gerät der Integrator aus seinem Basisliniennachziehbereich. Ferner müßte bei extremen Dosierungen dann auch eine Verstärkerumschaltung vom Densitometer her erfolgen. Eine on line-Auswertung wäre mit einem viel höheren instrumentellen Aufwand verbunden. Der Fehler der Methode liegt bei 3.1 % für Acetylsalicylsäure und 1.6 % für Coffein ( n = 18 ). Die auf der Flanke gemessene stärkere Konzentration verursacht den größeren Fehler. Hier tun sich Grenzen auf, auch hinsichtlich der Linearität überladener Fleckzonen, wie sie im Fall der Coffein/Phenacetin -Bestimmung ( s. Kap. 3.1.4.) im Verhältnis 4 : 1 noch nicht festzustellen waren. Der mittlere Tablettengehalt von CAFASPIN wurde mit  $508.0 \pm 19.0$  mg für Aspirin und  $49.6 \pm 2.5$  mg für Coffein ermittelt ( n = 18, theoret.: 500 bzw. 50 mg ).

## 7. Vergleich: Regression über Eichgeraden und Methode des internen Standards (62)

### 7.1. Dreikomponentenanalyse

Mit der Analgetikakombination Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Coffein sollen die Verfahren des Ausgleichs über Eichgeraden und die Methode des internen Standards einander gegenübergestellt werden. Die Analyse erfolgt durch Remissionsmessung. In beiden Fällen besteht linearer Zusammenhang zwischen Meßwert und Konzentration. Prinzipiell kann man zusammenfassen:

Die Aufstellung der drei Eichgeraden erfolgt über den Sollwert und die  $\pm 10\%$ -Abweichung, jeweils doppelt aufgetragen. Vorteilhaft ist hier die Absicherung der Eichbeziehung über sechs Punkte pro Substanz. Dem Auftragefeher wird durch die Mittelung von zwei gleich großen Konzentrationen Rechnung getragen. Nachteilig ist der hohe Meßaufwand bei geringer Analysenzahl pro Platte.

Bei der anderen Methode werden nach Zugabe des Standards, in diesem Fall PHB-Äthylester (größter Rf-Wert in der Kombination), Probe und Vergleich unter Elimination des Auftragefeherers direkt ins Verhältnis gesetzt. Neben Zeitgewinn und Platzersparnis auf dem Chromatogramm ist der Arbeitsaufwand, bezogen auf die Analysenzahl, wesentlich kleiner. Außer der Standardzugabe in die Analysen braucht nur eine Eichlösung hergestellt zu werden. Eine mögliche Unsicherheit bietet die Einpunktbeziehung über jeweils eine Vergleichsbahn bei mehreren Probebahnen, weil hierbei Störungen vom Plattenuntergrund eine Eichung leicht zunichtemachen können. Der Zufallsfehler von der Messung her wird jedoch klein gehalten, da die Flächenwerte ebenfalls nach Vor- und Rückscan gemittelt werden.

Die Anordnung von Probe und Vergleich auf einer Platte sorgt bei beiden Auswertungen dafür, daß Gradienten in die Eichung miteingehen, beim Verfahren über drei Eichgeraden nach dem Schema:

110 110 100 A A 100 90 90

nach der Methode des internen Standards nach der Anordnung:

E A A A E A A A

An verschiedenen Tagen wurden Meßreihen nach beiden Verfahren durchgeführt, zur Austestung zunächst mit Einwaagen genau definierter Mengen, später auch mit Tabletten (THOMAPYRIN N).

Aus technischen Gründen konnte dabei allerdings eine Einzeltablette nur jeweils nach einem Verfahren bestimmt werden, da die Ansatzlösungen verschieden hergestellt werden ( Zugabe des Standards ).

Die Ergebnistabelle (19) zeigt, daß hinsichtlich der Genauigkeit der Fehler für beide Auswertungen in der gleichen Größenordnung liegt ( Einzelergebnisse siehe Tab.27 ). Die praktischen Vorteile der Methode des internen Standards kommen somit voll zur Geltung. Der Fehler der Tablettenanalysen muß zwangsläufig nach beiden Verfahren höher sein, da folgende Unsicherheiten hinzukommen: Gewicht der Einzeltablette und Dosierung der Einzelsubstanzen. Die höhere Streuung der Ergebnisse bei Coffein scheint mit den technologischen Eigenschaften dieser Substanz zusammenzuhängen. Ähnliche Ergebnisse für Mehrkomponentenanalysen mit Coffein wurden auch bei Analgetikakombinationen anderer Hersteller gefunden.

Tabelle 19

| Substanz           | rel. Gehalt<br>( % ) | $\sigma_{\text{rel}}$<br>( n = 16 ) | Methode       |
|--------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------|
| Acetylsalicylsäure | 100.17               | 2.30                                | 3 Eichgeraden |
| Paracetamol        | 100.59               | 1.82                                |               |
| Coffein            | 101.11               | 2.58                                |               |
|                    | 99.27                | 2.01                                | interner      |
|                    | 97.86                | 2.04                                | Standard      |
|                    | 99.80                | 3.02                                |               |
| Tabletten          | 102.6                | 4.43                                | 3 Eichgeraden |
| THOMAPYRIN N       | 97.7                 | 4.10                                |               |
|                    | 102.0                | 4.51                                |               |
|                    | 100.2                | 2.79                                | interner      |
|                    | 97.6                 | 4.51                                | Standard      |
|                    | 99.2                 | 6.27                                |               |

## 8. Einflußfaktoren des Standards

### 8.1. Vierkomponentenanalyse

Zur Untersuchung kam ein Analgetikagemisch, bestehend aus Phenazon (1), Coffein (2), Aminophenazon (3) und Phenacetin (4) im Verhältnis 3 : 1 : 3 : 3, unter Zusatz von zwei Teilen PHB-Propylester (5) als internem Standard. Hier soll nun die Frage erörtert werden, inwieweit die Lage eines oder mehrerer Standardflecken auf einer Chromatogrammbahn das Analysenergebnis beeinflusst. Die Substanzen wurden punktförmig aufgetragen, linear gescannt und on line ausgewertet. Das hierzu notwendige Rechenprogramm gibt Abb.14 in Form eines Fließschemas wieder. Es steht exemplarisch für alle Auswertungen mit internem Standard. Wesentliches Element ist auch hier die Abspeicherung der Eich- und Analysenflächenwerte über denselben Programm- in verschiedene Konstantenspeicher mit Hilfe extern gesteuerter Adressenmodifikation. Die Nummerierung der Substanzen entspricht den ansteigenden  $R_f$ -Werten im Chromatogramm.

#### 8.1.1. Lage des Standards

Beschränkt man sich bei der Auswertung nicht nur auf Substanz 5 als Standard, sondern läßt diesen variieren, so daß jede Komponente einmal als solcher fungiert, so erkennt man den von der Lage des Standards abhängigen Fehler. Die Darstellungen in Abb.15 machen deutlich, daß die Fleckzonen in Nachbarschaft zum Standard mit kleineren Fehlern behaftet sind. Je weiter der Abstand von diesem, desto größer der Fehler. Dieser rührt daher, daß es auf langen Chromatogramabschnitten, wie sie sich bei Vielkomponententrennungen zwangsläufig ergeben, durch Gradienteneinwirkung zu Abweichungen von der senkrechten Fleckanordnung kommt, und die Zonen dadurch nicht mehr optimal im Meßspalt zentriert liegen. Es genügt schon eine inhomogene Fleckverteilung und damit verbunden eine geringfügige Verschiebung des Absorptionsmaximums aus der Spaltmitte. Obwohl die Meßspaltlänge alle Fleckzonen umfaßt, kommt es zu erheblichen Intensitätseinbußen.

Bei der Versuchsdurchführung haben wir den größten Fleck des Phenacetins positioniert. Streng genommen müßte man jede Substanz in der Bahn neu im Meßspalt justieren, was jedoch der von uns eingesetzten automatisierten Auswertung entgegensteht.

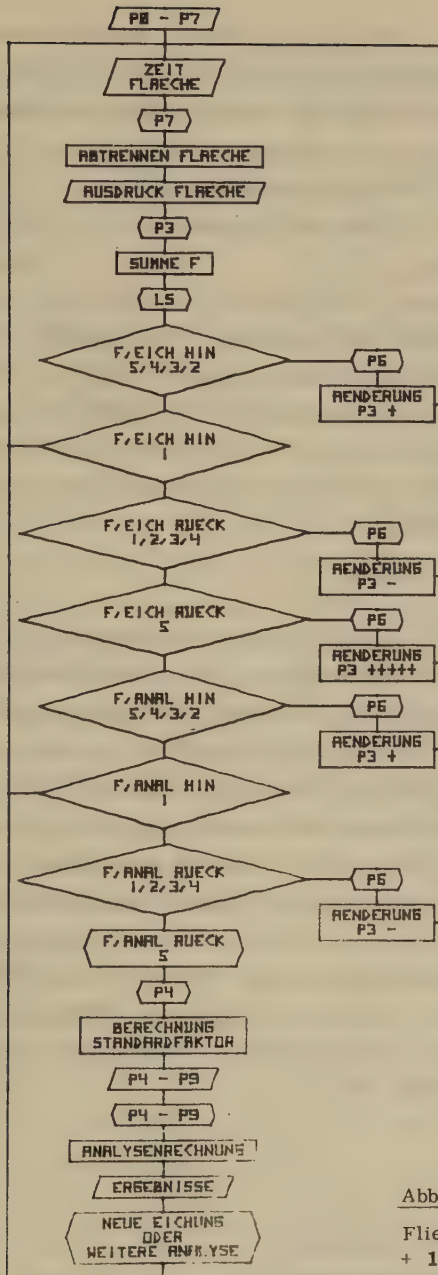


Abb.14

Fließschema: 4 Komponenten  
+ 1 interner Standard

Ein möglicher Ausweg wird in Kapitel 10 beschrieben. Ohne Veränderung des Meßsystems ergibt sich die Konsequenz, bei großen Chromatogramdstrecken mehrere Standards einzusetzen, auch wenn dann der Aufwand für eine einwandfreie Abtrennung der Stoffe groß wird. Betrachtet man Substanz 1 und 5 als Standard, resultiert bei der Auswertung von Fleck 2, 3 und 4 ein mittlerer Fehler von 2.5 %, bei alternierender Standardfolge 1, 3, 5 wird der mittlere Fehler für Fleck 2 und 4 auf 2.3 % reduziert.

Auch die Zahl der Eichbahnen pro Chromatogramm hat Einfluß auf das Analysenergebnis. Mit Probe und Vergleichsbahnauswertung auf engstem Raum, alternierend aufgetragen, wurden die o.a. Berechnungen durchgeführt (Abb.15). Bei nur einer Eichbahn pro Platte kann sich im ungünstigsten Fall das Ergebnis bis zu 2 % verschlechtern. Die Vermutung, daß jeweils die Außenbahnen auf Grund von Randeffekten ungünstigere Werte liefern, konnte nicht bestätigt werden, da wir grundsätzlich am Plattenrand 2 cm frei ließen.

#### 8.1.2. Externer Standard

Geht man davon aus, daß mit dem Einsatz präziser Auftragesysteme der Dosierfehler mit weniger als 1 % vernachlässigbar klein ist, kann auf den Zusatz eines internen Standards verzichtet werden. Setzt man die Meßdaten von Probe und Vergleich direkt ins Verhältnis, kommt man zu Ergebnissen, die - wiederum bezogen auf obige Bestimmung - für alle Komponenten zwischen 2.7 und 4.4 % liegen. Besonders günstig wirkt sich die Methode des externen Standards bei nur einer Eichbahn pro Platte aus, da bei Abweichungen der Fleckflächen, die nicht auf Dosierfehler zurückzuführen sind, der Proportionalitätsfaktor des ursprünglichen internen Standards, wegfällt. Man beobachtet jedoch systematische Abweichungen der Ergebnisse innerhalb einer Chromatogrammbahn. Dies muß als geringfügige Dosierschwankung gedeutet werden. Tabelle 20 macht diesen systematischen Gang bei der Angabe der Mittelwerte in der Vertikalen deutlich. Diese basieren auf der Auswertung von zehn Platten mit je acht Bahnen.

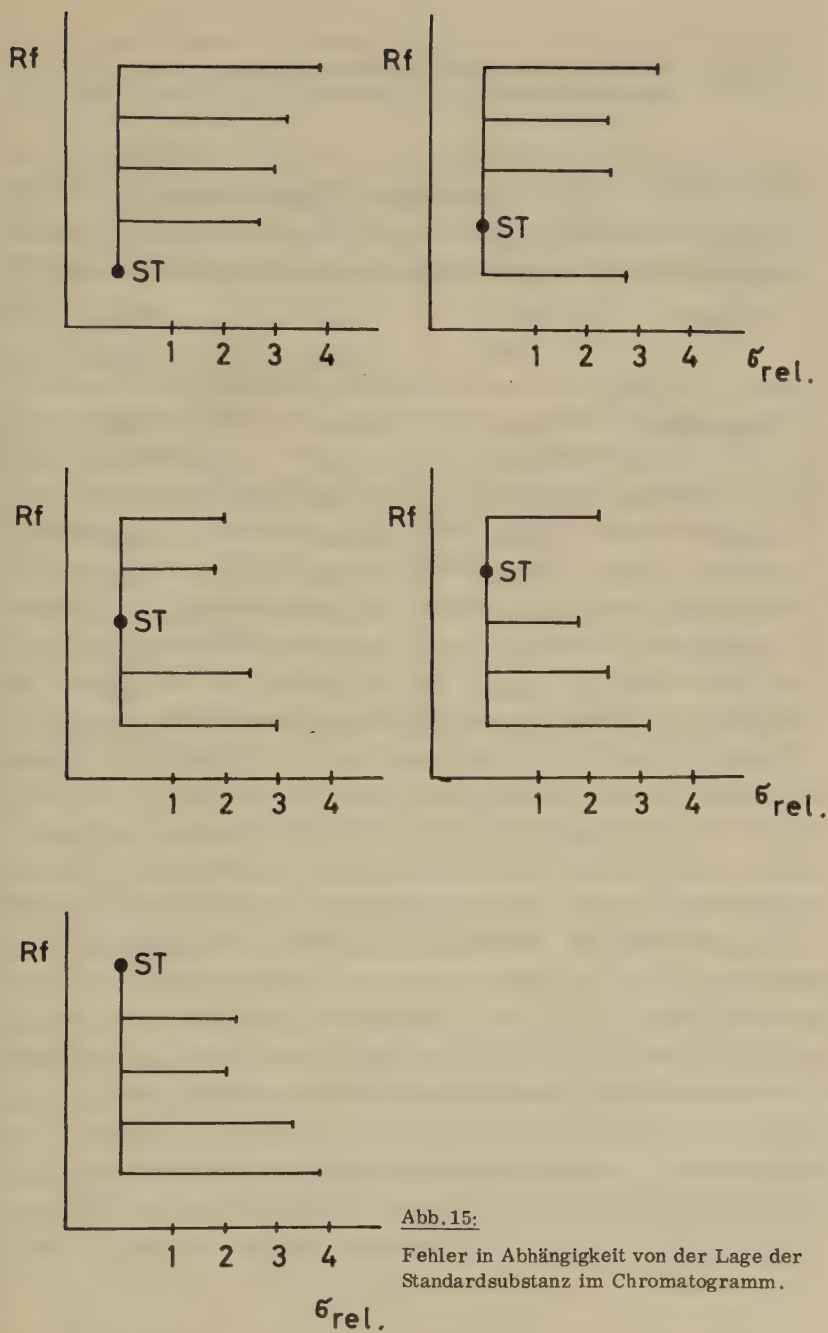


Tabelle 20: Mittelwerte und relative Standardabweichungen ( n = 40, 64, 72, je nach Auswertung ).

| Substanz      | Mittelwert und Standardabweichung |             |           |
|---------------|-----------------------------------|-------------|-----------|
|               | EA , EA                           | EAAA , EAAA | AAAF AAAA |
| Phenacetin    | 99.25                             | 98.76       | 100.55    |
|               | 3.038                             | 2.732       | 3.737     |
| Aminophenazon | 99.51                             | 99.19       | 101.12    |
|               | 3.202                             | 3.035       | 3.902     |
| Coffein       | 99.87                             | 99.29       | 100.87    |
|               | 2.867                             | 3.170       | 3.951     |
| Phenazon      | 99.64                             | 99.16       | 101.80    |
|               | 3.247                             | 3.771       | 4.437     |

## 9. Automatisierter Scanbetrieb durch Analogsteuerung ( 64 )

### 9.1. Bestimmung von Aminophenazon

Bei der Bestimmung von Aminophenazon mit Phenazon als internem Standard testeten wir ein vollautomatisches DC-System durch. Die Steuerung des ZEISS-Scanners übernahm eine Analogeinheit ( 34 ), die dafür sorgte, daß jede Dünnschichtplatte nach dem Positionieren der ersten Bahn ohne manuellen Eingriff vollständig gescannt wurde.

#### 9.1.1. Durchführung und Problematik

Der Arbeitsablauf sieht so aus, daß der Plattentisch zunächst in Bahnrichtung vor und nach Erreichen eines Endabschalters wieder zurückgeführt wird. Berührt der Tisch den zweiten Endabschalter, löst dieser die Bewegung zur nächsten Chromatogrammbahn aus. Während dieser Zeit wird der Integrator automatisch auf "reset" geschaltet, um möglichen Störungen der Integration vom Untergrund her entgegenzuwirken. Nach Erreichen des an der Steuereinheit eingestellten Bahnabstandes beginnt der Arbeitsablauf von neuem, bis eine variable Bahnzahl erreicht ist. Für den Transport des Plattentisches in x- und y-Richtung sorgen Synchronmotoren, die im Vergleich zu impulsgesteuerten Schrittmotoren mit einem Fehler hinsichtlich ihrer Präzision behaftet sind. Diese machen sich in y-Richtung, also innerhalb einer Bahn, praktisch nicht bemerkbar, wenn man die Endabschalter in genügendem Abstand vom ersten und letzten Fleck einstellt. Problematisch ist aber die Ansteuerung der einzelnen Bahnen, zumal bei punktförmiger Auftragechnik. Der Bahnabstand wird über einen Präzisionszeitgeber geregelt. Dieser versorgt den Motor für die x-Richtung für eine bestimmte Zeit mit Strom. Da jedoch die Quarzzeitbasis eine - wenn auch geringe - Ungenauigkeit zuläßt, muß sich diese zwangsläufig von Bahn zu Bahn auswirken und vergrößern. Wird z.B. ein Fleckzentrum auf der letzten Bahn um 1 mm verfehlt, resultieren die in Abb.16 am Beispiel eines Aminophenazon-Flecks registrierten Abweichungen der Remissionsgrad-Ortskurven. Um nun systematische Ansteuerungenauigkeiten des Systems möglichst klein zu halten, legten wir - bei 20 mm Geräteeinstellung für den Bahnabstand - die experimentell ermittelten Intervalle auf einer Schablone fest, die wir später beim Auftragen von Probe- und Vergleichslösungen verwendeten.

Ein eventueller Getriebeschlupf schied als Fehlerquelle aus, da die Startmarkierung der ersten Bahn auf jeder Platte manuell mit der Kontrollanzeige am Densitometer in Übereinstimmung gebracht werden mußte und dabei darauf geachtet wurde, daß sich die Zahnräder des Getriebes im Anschlag befanden. Vergleichende Messungen zeigen ( Tab. 21 ), daß der Meßfehler im automatischen Betrieb gegenüber der manuellen Plattentischverschiebung um 0.5 % steigt. Dies resultiert zwangsläufig aus den erläuterten Ursachen.

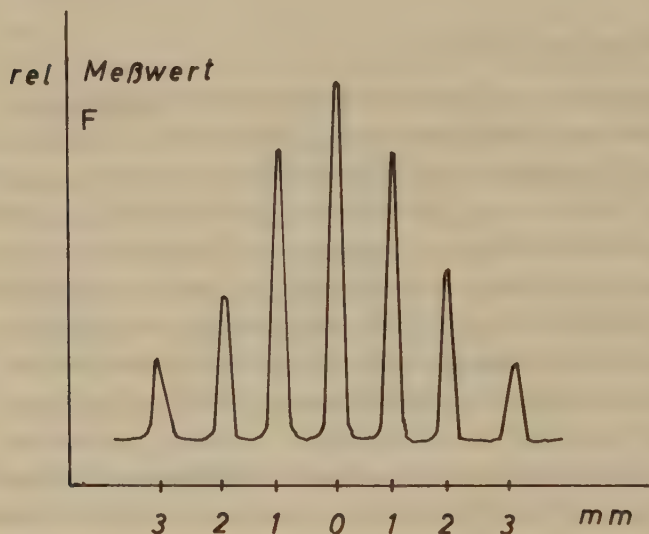


Abb.16

### 9.1.2. Dreipunktauftragung

Wir sahen unsere Aufgabe darin, bei gegebenen Gerätefehlern einen Ausweg zu suchen und ersetzen die Einpunkt- durch eine Dreipunktauftragung. Dazu trugen wir jeweils auf die Startmarkierung im Abstand von 2 mm drei Punkte auf. Hieraus bildeten sich nach der chromatographischen Entwicklung bandenförmige Fleckzonen. Wählt man nun einen kleinen Meßspalt, etwa 3.5 mm Länge, so wird beim Scannen nur ein aliquoter Teil aus dem Fleckenband erfaßt.

Jetzt sollten sich Bahnansteuerungenauigkeiten nicht mehr auswirken. Wie aus der Ergebnistabelle ( 21 ) hervorgeht, wird der Fehler jetzt mit 1.27 % noch kleiner als im manuellen Betrieb. Dies muß so interpretiert werden, daß eine spaltförmige Meßfläche, die eine Fleckzone ganz, somit auch ihre unregelmäßige Form und Größe miterfaßt, das Ergebnis verschlechtert. Die bereits angesprochene Dezentralisierung aus der Spaltmitte bei der Simultanbestimmung mehrerer Flecken pro Bahn kommt noch hinzu. Diese Einflüsse scheiden bei der Ausschnittmessung eines homogenen Fleckenbandes aus.

Die neben der Integratorauswertung vorgenommene Berechnung des Ergebnisses über die Peakhöhen der Remissions-Ortskurven ergibt einen Fehler in der gleichen Größenordnung. Bei der Dreipunktauftragung liegt der Fehler erstmals unter 1 %. Es kann somit gezeigt werden, daß man im eingeschränkten Konzentrationsbereich selbst bei Densitometern ohne logarithmischen Ausgang auch ohne Integration auskommen kann.

Tabelle 21  $\sigma_{\text{rel}} (n = 30)$

| Einpunktauftragung |          |             |          | Dreipunktauftragung |          |
|--------------------|----------|-------------|----------|---------------------|----------|
| DC manuell         |          | DC auto     |          | DC auto             |          |
| Integration        | Peakhöhe | Integration | Peakhöhe | Integration         | Peakhöhe |
| 1.46               | 1.54     | 2.06        | 2.22     | 1.27                | 0.94     |

Die Bestimmung von Aminophenazon in "PYRAMIDON 0.3" Tabletten ergab einen mittleren Gehalt von  $297.1 \pm 6.2 \text{ mg}$  ( = 2.1 % ).

### 9.1.3. Betrachtung des Zeitbedarfs

Die Vorteile des automatisierten DC-Betriebes in Verbindung mit der Auswertung des internen Standards werden in der folgenden Übersicht noch einmal herausgestellt. Arbeitersparnis und Zeitgewinn ( Faktor 1 : 4 ) verbinden sich mit höherer Präzision. Diese Vorzüge vergrößern sich noch bei der Analyse von Vielkomponentengemischen.

Klassisches DC-Verfahren

Automatisches DC-System

ZEIT

Min. / 12 Analysen

|                                                                                                                              |          |          |                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Herstellen</p> <p>12 Analysenlösungen</p> <p>4 Eichlösungen</p> <p>4 E / 4 A</p> <p>pro Platte</p> <p>5 Min. / Lösung</p> | 80       | 65       | <p>Herstellen</p> <p>12 Analysenlösungen</p> <p>1 Eichlösung</p> <p>2 E / 6 A</p> <p>pro Platte</p> <p>Standardzugabe zur Analyse durch Pipettieren aus einer Stammlösung</p> |
| <p>Auftragen mit Spritzensystem</p> <p>2 Min. / Auftragung</p> <p>insgesamt 3 Platten</p>                                    | 48       | 8        | <p>Auftragen mit Mikrokapillaren</p> <p>30 Sek. / Auftragung</p> <p>insgesamt 2 Platten</p>                                                                                   |
| <p>Positionieren 8mal</p> <p>Scanbetrieb manuell</p> <p>Aufnahme der Remissions-Ortskurven</p> <p>30 Min. / Platte</p>       | 90       | 10<br>40 | <p>Positionieren mit Synchronmotor 1mal</p> <p>= 5 Min.</p> <p>Scanbetrieb automatisch</p> <p>20 Min. / Platte</p>                                                            |
| <p>Auswertung graphisch</p> <p>Aufstellen der Eichfunktion graphisch</p>                                                     | 45<br>30 | 0<br>0   | <p>Auswertung automatisch</p> <p>Integrator / Rechner on line-Kopplung</p>                                                                                                    |

|                   |     |     |
|-------------------|-----|-----|
| Manuelle Zeit:    | 293 | 123 |
| davon Gerätezeit: | 90  | 40  |

## 10. Linear- und Zick-Zack-Scansystem

Variierende Fleckform und Größe, vor allem bei Mehrkomponentenanalysen, können nach der Linearscanmethode im bisher geschilderten automatisierten DC-Betrieb nur bedingt berücksichtigt werden.

Die Weiterentwicklung im Falle punktförmig aufgetragener Fleckzonen wird zur Digitaltechnik in Verbindung mit Schrittmotoren und Rechnersteuerung (34) führen. Ein solches System ist in der Lage, während des automatischen Scanbetriebes jeden Fleck in der Bahn zu erkennen und einzeln nachzupositionieren, darüber hinaus alle Bahnen anzusteuern und eine entsprechende Auswertung vorzunehmen. Hierzu werden jedoch größere Tischrechner benötigt, die den in dieser Arbeit aufgezeigten Rahmen sprengen würden. Für die bandförmige Auftragetechnik, wobei weitgehendste homogene Substanzverteilung vorauszusetzen ist, und segmentierendem Scan dürfte auf Grund der Ergebnisse des Analogsystems ( s.Kap. 9 ) eine einfache Digitalsteuerung für die Routine-DC eine Verbesserung bringen und präzise genug sein. Will man bei punktförmig aufgetragenen Fleckzonen, die im Laufe der chromatographischen Entwicklung unsymmetrisch geworden sind, höhere Präzision erreichen, muß man vom Linear- auf das Zick-Zack-Scansystem übergehen.

### 10.1. Zick-Zack-Prinzip

Für unsere Untersuchungen stand uns der SHIMADZU-Scanner CS - 900 zur Verfügung. Er arbeitet diesbezüglich nach folgendem Prinzip: Bei festgelegter Scangeschwindigkeit schwingt ein quadratischer Lichtstrahl unter einem errechneten Winkel diagonal zur Bahnrichtung. Die Größe des Meßquadrates von 1,25 x 1,25 mm ist dem Tischvorschub von 10 mm pro Minute so angepaßt, daß die Fleckzonen auf dem Chromatogramm, bzw. der jeweilige Plattenuntergrund, in durch die Diagonalebewegung definierten Dreiecksflächen jeweils doppelt bestrichen werden ( Abb.17 ) (29).

#### 10.1.1. Unsymmetrische Fleckzonen

Selbst bei stark deformierten Fleckzonen wird das Maximum exakt registriert, vom Integralschreiber werden die Einzelflächen der Diagonalebewegungen aufsummiert. Dabei spielt die Scanrichtung keine Rolle, wie folgende Betrachtung zeigt ( s.Abb.18 ).

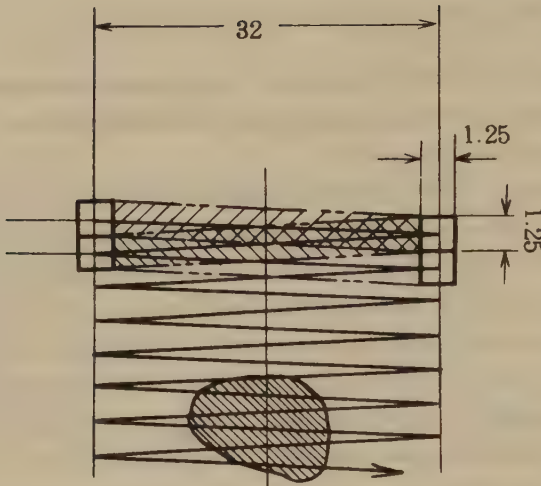


Abb.17

Die bei der Linearscanmethode erzielten richtungsabhängigen Flächenwerte lassen sich auf folgende Ursachen zurückführen:

- Eine längliche Spaltblende registriert jeweils nur einen komplexen Durchschnittswert über die Gesamtfleckfläche
- der Spaltumriß kann den Fleck nicht gleichmäßig ausleuchten
- die bereits erläuterte Schwierigkeit, das Fleckzentrum mit dem Meßspalt zu treffen.

#### 10.1.2. Verteilung bei annähernd ideal runden Fleckzonen

Es stellt sich hier die Frage, ob auch in diesem Fall Vorteile durch Zick-Zack-Messung zu erzielen sind. Als Modellsubstanz wählten wir Sudanrot. Aufgetragen wurde achtmal dieselbe Konzentration von  $0.5 \mu\text{g}$  stufenförmig, um jeweils 1 cm in Laufrichtung versetzt. Beim Fleck mit der größten Laufstrecke sollte am ehesten eine Deformation und somit eine unsymmetrische Substanzverteilung eintreten. Insgesamt müßten Ortskurven mit ähnlicher Fläche für alle Fleckzonen resultieren, weil sich Flächenausdehnung und Intensität reziprok verhalten.

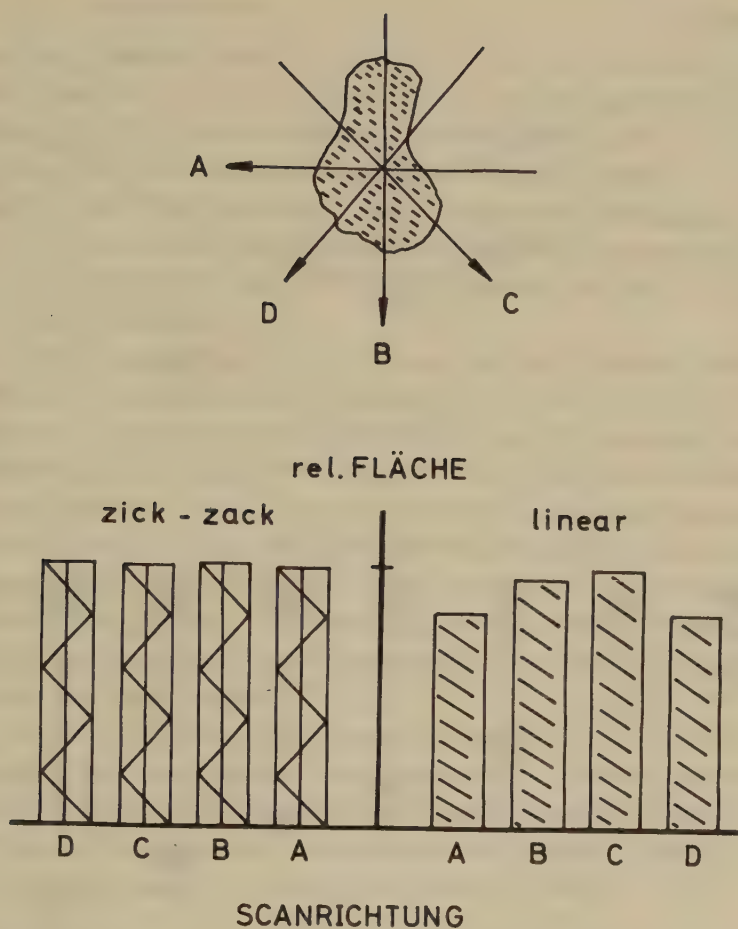


Abb. 18

In vergleichenden Messungen wurden dieselben Platten im Einstrahl- ( ZEISS, SCHOFFEL ) und Zweistrahlverfahren ( SCHOFFEL ) mit Spaltblende linear bzw. nach dem Zweiwellenlängenverfahren zick-zack-gescannt ( SHIMADZU ). Abb. 19 enthält die Ergebnisse. Die Meßwerte von Peakhöhe x Halbwertsbreite sind auf Fleck Nr. 8 normiert. Sieht man von der ZEISS-Auswertung ab, kann festgestellt werden, daß selbst unter der Bedingung unterschiedlicher Laufstrecken sowohl mit der Spaltblende im Linear- als auch mit dem Meßquadranten im Zick-Zack-Scan ähnliche Ergebnisse resultieren.

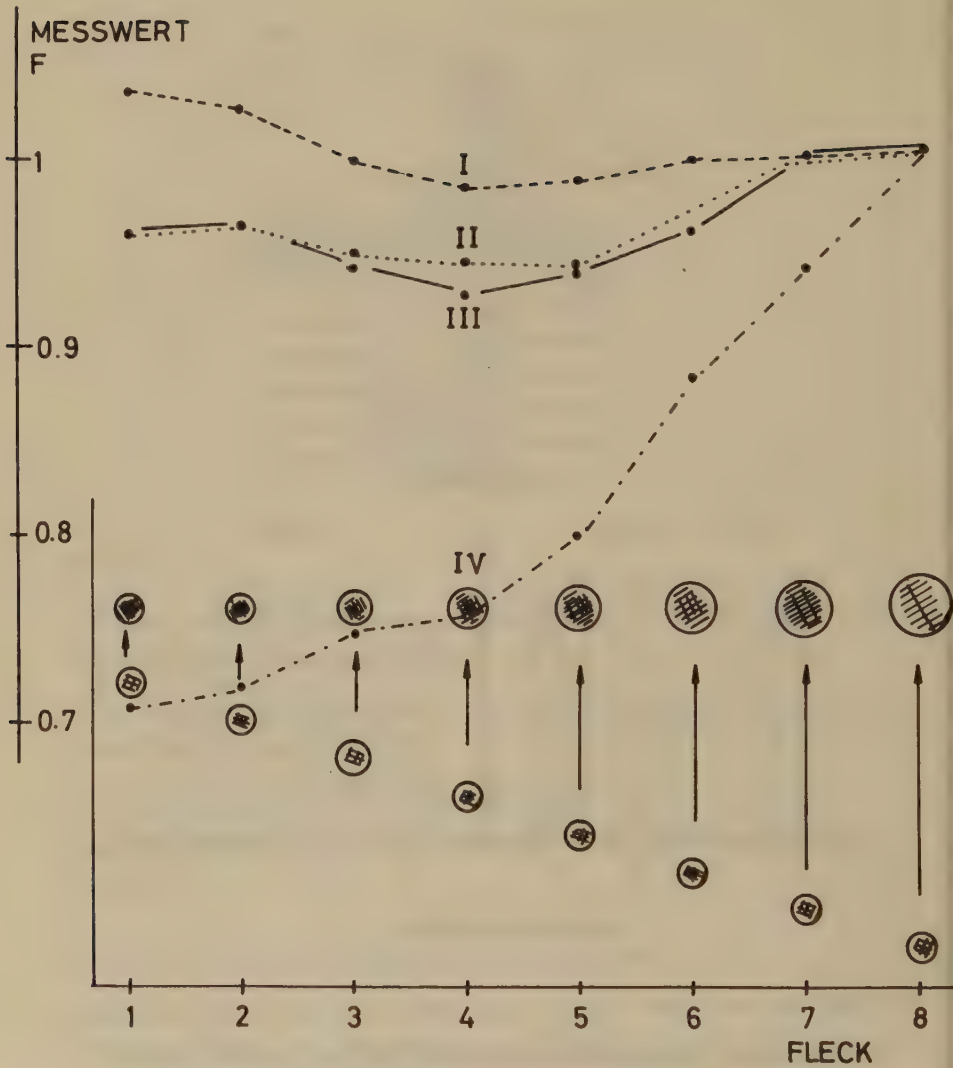


Abb. 19: Gleiche Konzentrationen von Sudanrot bei unterschiedlicher Laufstrecke.

- I : Zick-Zack, Zweiwellenlängen, SHIMADZU
- II : Linear, Zweistrah, SCHOFFFEL
- III : Linear, Einstrahl, SCHOFFFEL
- IV : Linear, Einstrahl, ZEISS

### 10.1.3. "Fleckeindringtiefe"

Von diesen Ergebnissen weichen die mit dem ZEISS-DC-Spektralphotometer erhaltenen Werte völlig ab. Diese lassen den Schluß zu, daß der Fleck mit der kleinsten Laufstrecke und der höchsten Substanzdichte nicht quantitativ erfaßt wird. Diese Tatsache hat in der Literatur (22) zu folgender Interpretation geführt:

Eine Fleckzone dringt beim Auftragen tief in das Sorbens ein und wandert im Laufe der chromatographischen Entwicklung mehr und mehr an die Oberfläche. Dieser Vorgang soll durch den Abdunsteffekt des Fließmittels von innen, also vom Träger her, nach außen begünstigt werden.

Eine solche Deutung lassen jedoch die Meßergebnisse mit den anderen Densitometern nicht zu. Eine unterschiedliche "Fleckeindringtiefe" ist auch schwer vorstellbar, wenn man - gerade bei der Chromatographie von leuchtenden Farbstoffen - die Dünnschichtplatten von beiden Seiten betrachtet und rein visuell keine Intensitätsunterschiede feststellen kann, zumal die Schichtdicke im analytischen Bereich nur 0.25 mm beträgt. Letztlich soll auch die Wanderung der Substanzen aus unterschiedlichen Tiefen an die Oberfläche mit der Fleckverbreiterung bei zunehmendem Rf-Wert in Verbindung stehen. Diese ist jedoch in erster Linie durch Diffusions- und Verteilungsvorgänge bedingt, zusätzlich abhängig von Temperatur, Viskosität, aber auch von der Substanz selbst.

Mit denselben Platten durchgeführte Transmissionsmessungen, mit denen man noch besser die Tiefe eingedrungener Fleckzonen erfassen kann, führten zu gleichen Ergebnissen, wohingegen bei Simultanmessungen am ZEISS-Gerät (Remission / Transmission 100 : 50) wieder die Abweichungen auftraten. Vermutlich liegt die Ursache hierfür im optischen Abbildungssystem des ZEISS-Gerätes.

### 10.2. Vergleich: Fluoreszenz im Linear-, Remission im Zick-Zack-Scan

Die Fluoreszenz ist der Remission nicht nur bezüglich der Empfindlichkeit, sondern auch hinsichtlich ihrer Präzision um ca. 1 % überlegen. Da unser Datenmaterial bisher ausschließlich auf Linearscanmessungen mit der Spaltblende beruht, konnte man vermuten, daß sich durch die bessere Auflösung beim Zick-Zack-System der Fehler zwischen Fluoreszenz und Remission verkleinert.

Um dies nachzuweisen, wurde Salicylsäure im eingeschränkten Bereich von 400 ng  $\pm$  10 % fluorimetrisch im Linearscan und in Remission durch Zick-Zack-Abtastung analysiert.

Hinsichtlich der optischen Meßmöglichkeit stellen diese Konzentrationen einen Kompromiß dar. Sie liegen relativ hoch für die Fluoreszenz und im unteren Bereich für die Remission.

Bei gleichem Plattenmaterial und gleicher Auswertung über die Peakhöhen - am SHIMADZU CS - 900 kann bisher noch keine automatisierte Auswertung durchgeführt werden - kommt es zu folgenden Fehlern ( Tab.22 ):

Tabelle 22

$\sigma_{\text{rel}}$  (n = 24)

|                                                |        |
|------------------------------------------------|--------|
| linear , Fluoreszenz , 1 Strahl ( ZEISS )      | 1.38 % |
| linear , Fluoreszenz , 2 Strahl ( SCHOFFEL )   | 1.39 % |
| Zick-Zack , Remission, 2 Wellenl. ( SHIMADZU ) | 2.62 % |

Aus diesen Zahlen folgt unmittelbar, daß die in situ-Fluoreszenz der Remission auch unter dem Blickwinkel der Zick-Zack-Meßtechnik weiterhin um etwa 1 % überlegen bleibt. Es zeigt sich außerdem, daß bei der spezifischen Fluoreszenzmessung ( nur das emittierte Licht erreicht den Empfänger ) die Unterschiede zwischen Einstrahl- und Zweistrahilverfahren wesentlich geringer sind als in Remission.

### 10.3. Fluoreszenzminderung

Wir gingen schließlich der Frage nach, inwieweit Vorteile mit dem Zick-Zack-Scan bei der indirekten Absorptionsmessung, auch "Fluoreszenz Quenching" genannt, zu erzielen sind. Ein DC-Fleck, der sich bei der Wellenlänge maximaler Absorption messen läßt, kann auch auf einem Sorbens bestimmt werden, dem ein Fluoreszenzindikator zugesetzt ist. Man regt diesen bei 254 nm an und mißt das um den DC-Fleck verminderte Fluoreszenzlicht. Man sollte diese Methode exakterweise nicht als "Fluoreszenz Quenching" bezeichnen, weil kein eigentlicher Quenching-Effekt vorliegt, der eine Übertragung der Fluoreszenzanregungsenergie vom angeregten auf ein nicht fluoreszierendes Molekül beinhaltet. Gegenüber der reinen Remissionsmessung bestehen hierbei folgende Nachteile:

- Je weiter das Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz von 254 nm entfernt liegt, desto höher ist der Empfindlichkeitsverlust bei der Messung.
- Der Fluoreszenzindikator läßt sich nicht homogen in der Plattenschicht verteilen.

- Das Signalrauschverhältnis ist wesentlich schlechter als in Remission.
- Bei der Registrierung leuchtet der Indikator nach, so daß man besser von Phosphoreszenzminderung sprechen sollte.

Es ist auch üblich, gleichzeitige Remission und Fluoreszenzminderung, also Remission bei maximaler Absorption der Substanzen im Bereich um 250 nm auf Fluoreszenzschichten durchzuführen. Diese "gemischte Messung" soll empfindlicher sein als die reine Remission. Vorteilhaft ist auch die zusätzliche visuelle Kontrolle der Chromatographie auf Fluoreszenzschichten. Man erhält Eichkurven, die über das Flächenquadrat gegen die Konzentration linearisiert werden können.

Bezüglich des Meßfehlers ergeben sich keine Vorteile gegenüber der reinen Remissionsmessung. Dies bestätigen Untersuchungen mit Coffein. Es wurden Eichreihen, bestehend aus vier Konzentrationen im Bereich von 0.5 - 1.25 µg, auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Fertigplatten erstellt und über die gemischte Remission bzw. nach der Methode der Fluoreszenzminderung im Linear- und Zick-Zack-Scan ausgewertet. Die Fehler liegen zwischen 5.1 und 5.8% (n = 18). Somit konnte die Vermutung nicht bestätigt werden, daß eventuell der Zick-Zack-Scan auf Grund seines besseren Auflösungsvermögens bezüglich der unregelmäßigen Verteilung des Fluoreszenzindikators einen signifikanten Genauigkeitsgewinn bringt. Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß bei der Auswertung der im Zick-Zack-Scan erstellten Remissions-Ortskurven nicht der Integrator des COLORA-Zweikanalschreibers herangezogen wurde, sondern die präzisere Aufaddition der Einzelsignale erfolgte.

#### 10.4. Schnellmethode mit dem Zick-Zack-Scan

Nachteilig bei der Zick-Zack-Messung ist die für die Integration festgelegte Tischvorschubgeschwindigkeit von 10 mm/min. Diese liegt gewöhnlich beim Linearscan in Verbindung mit der Integration bei 30 - 50 mm/min. Untersucht man eine Komponente pro Bahn, kann man die DC-Platte auch quer zur Entwicklungsrichtung scannen. Im Gegensatz zum Linearscan ist hierbei die ständige Neupositionierung der Fleckzonen nicht erforderlich.

Aber auch bei mehreren Komponenten pro Bahn kann diese Scanmethode beibehalten werden, wenn die Flecken innerhalb der Zick-Zack-Schwingbreite lokalisiert sind. Betrachtet sei zunächst das Beispiel Coffein / Phenacetin (s. auch Kap. 3.1.1.). Abb. 20 gibt den Ausschnitt der Registrierung eines Zweifleckprofils wieder.

Zu erkennen ist, daß jede Komponente doppelte Signale erzeugt. Dabei erreicht der Schreiber zwischen beiden Fleckzonen nur teilweise die Basislinie.

Ausgehend von dieser Tatsache wird die Simultanbestimmung beider Substanzen so durchgeführt: Man registriert mit der langsamsten Tischvorschubgeschwindigkeit von 2.5 mm/min und sorgt so für eine hervorragende Auflösung der Fleckzonen.

Es ist in jedem Fall sichergestellt, daß ein Scan das Konzentrationsmaximum durchläuft. Es genügt folglich, wenn man lediglich den mittleren Bereich des Fleckes wählt. Bei dieser Arbeitsweise kann man eine ganze Platte mit acht Bahnen in 10 min vermessen. In Verbindung mit der Methode des internen Standards wird anschließend über die Peakhöhen ausgewertet.

Betrachtet man Phenacetin als internen Standard, liegt der Fehler für die alternierende Auftragsweise von Probe und Vergleich bei 1.8 % für eine Fichbahn, gefolgt von drei Analysenbahnen bei 2.1 %, selbst für eine Fichbahn und sieben Analysen bleibt die genäherte relative Standardabweichung ( $n = 21$ ) bei diesem Wert.

Wir erweiterten diese Schnellmethode auf die Analyse von drei Komponenten, Coffein, Paracetamol und Aspirin (s. auch Kap. 7.1.), mit Fehlern von:

|          | EA    | EAAA  |
|----------|-------|-------|
| Coffein: | 1.9 % | 2.1 % |
| Aspirin: | 2.3 % | 2.5 % |

( Paracetamol als interner Standard ).

Beiden Verfahren liegt die Wellenlängenkombination 270 nm zur Messung und 350 nm zum Vergleich zugrunde. Bei dieser Differenz entstehen noch beachtliche Basisliniendriften. Grenzt man jene ein auf die Kombination 270 / 300 nm, resultiert eine weitere Glättung des Untergrundes ( Abb. 21 ). Im Falle der Coffein-Bestimmung bedeutet dies eine Senkung des Fehlers auf 0.5 % bei sieben Analysen pro Platte ! Eine solche Wellenlängenoptimierung kann jedoch nicht immer durchgeführt werden, da durch die Nähe der Referenzwellenlänge die Absorptionsspektren der zu bestimmenden Substanzen bereits überlagert werden. Im Falle der Coffein / Acetylsalicylsäure - Bestimmung ist für letztere Komponente bereits das Referenzsignal größer als das Meßsignal. Es kommt zu einem negativen Peak.

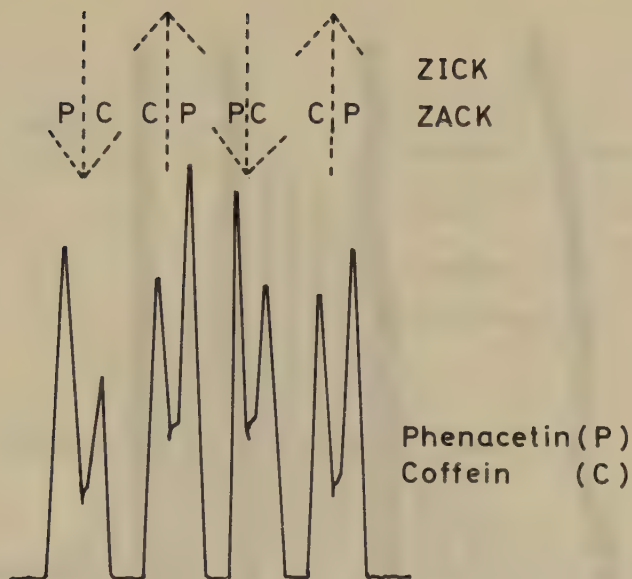


Abb.20: Ausschnitt einer Zick-Zack-Ortskurve.

Bei der Auswertung positiv / negativ gemischter Ortskurven ( Abb.22 ) liegt der Fehler für beide Substanzen bereits bei alternierender Eich-Analysenfolge zwischen 4 und 5 %. Man muß hier einräumen, daß nur die halbe Schreiberbreite pro Komponente herangezogen werden kann. Es ist zu vermuten, daß ein Präzisionsgewinn dann eintritt, wenn man das negative Signal elektronisch wandelt.

Aus der positiv / negativen Ortskurve geht übrigens noch deutlich hervor, was zur Lage der Standardsubstanz in der Fleckbahn nach der Linearscanmethode ( s. Kap. 8.1.1.) bereits ausgesagt wurde: Das seitliche Versetzen senkrecht angeordneter Fleckzonen. Selbst in dem hier gewählten Beispiel von nur drei Substanzen mit kleiner Wanderungsstrecke beträgt die Abweichung 0.3 mm, bezogen auf den unteren und oberen Fleck ( siehe Pfeile ).

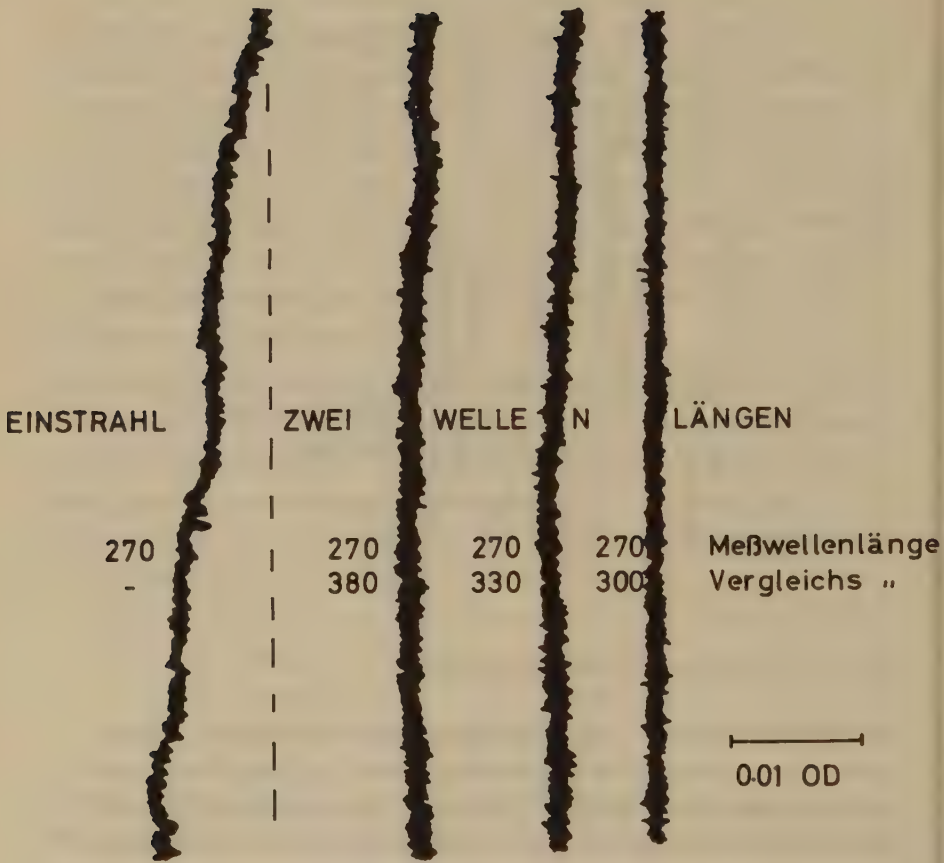


Abb.21: Registrierte Basislinien einer nicht entwickelten DC-Platte  
( ohne Substanzen ).

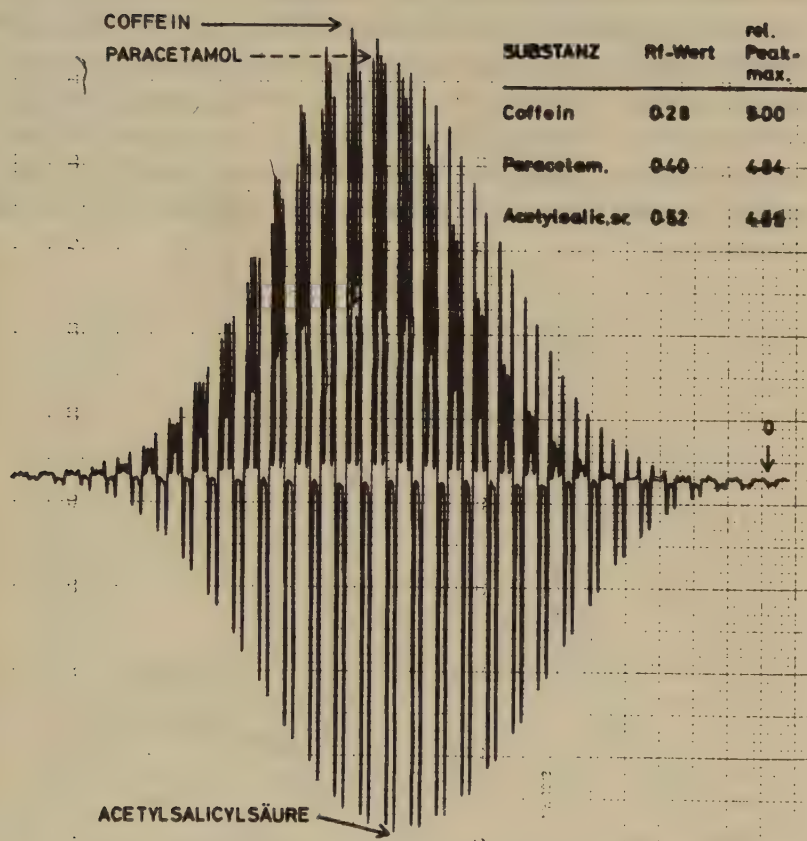


Abb. 22: Positiv / negative Zick-Zack-Ortskurve von 3 Substanzen.

# 11. Peakunterdrückung (65)

Die Zweiwellenlängenmethode bietet neben der Basislinienglättung die Möglichkeit, im Fall zweier nicht aufgelöster Peaks die eine Substanz zu erfassen und die andere, darunterliegende, zu eliminieren. Normalerweise wählt man in der Remissionsanalyse als Referenz eine Wellenlänge, bei der die zu untersuchenden Substanzen nicht absorbieren. Bei nicht getrennten Fleckzonen mit ähnlichen Spektren kommt es zu einer partiellen Überlagerung der Absorptionskurven. Wir wollen das Beispiel nicht getrennter Phenacetin/Coffein-Fleckzonen ( 2 bzw. 0.5  $\mu\text{g}$  ) heranziehen ( Abb.23 ).

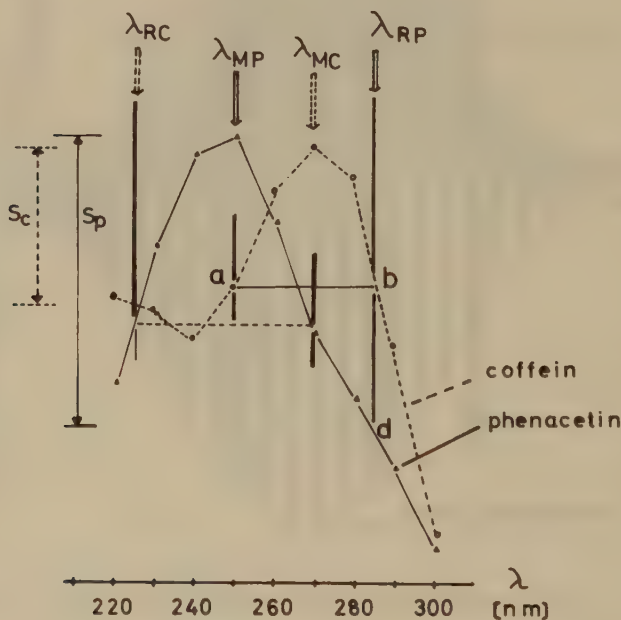


Abb. 23: Remissionsspektren von Phenacetin und Coffein.

Bei der Bestimmung der Komponente Phenacetin durch Wahl der Meßwellenlänge im Bereich maximaler Absorption ( MP ) wird die Nebenkompente Coffein auf der Flanke miterfaßt ( a ). Wählt man nun als Referenz die Wellenlänge ( RP ) im gegenüberliegenden Flankenpunkt ( b ), tritt quantitative Elimination von Coffein durch Kompensation ein.

Es kommt dabei zu einer Verkleinerung des maximalen Signals. Das resultierende Nutzsignal  $S_p$  setzt sich zusammen aus der Strecke des Phenacetinmaximums bis zum Schnittpunkt ( d ) der zugehörigen Vergleichswellenlänge. Entsprechend kann auch umgekehrt Phenacetin zur Bestimmung von Coffein ausgeblendet werden.

Abb. 24 zeigt die entsprechenden Ortskurven bei systematischer Änderung der Wellenlängen im Linearscan.

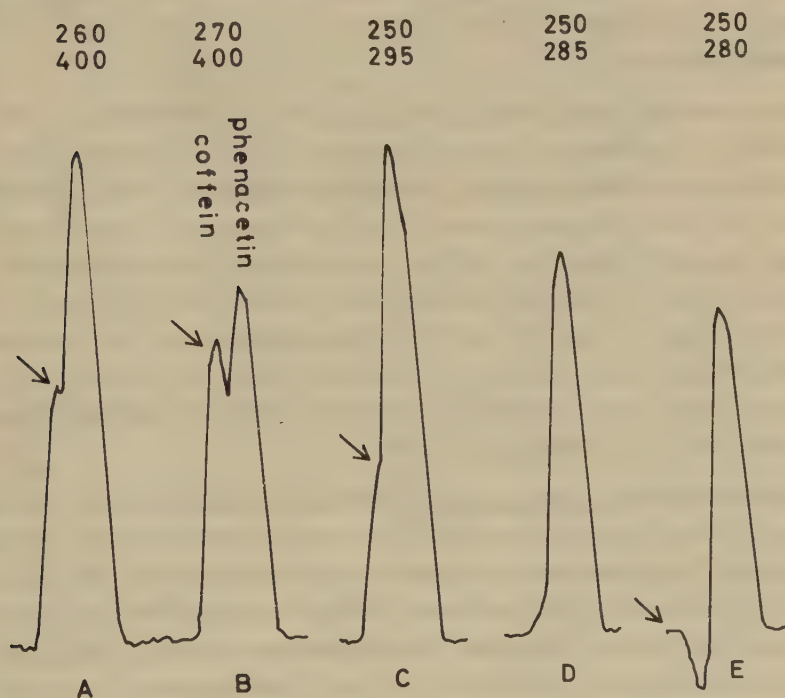


Abb. 24

Bereits Kurve A gibt zu erkennen, daß es sich um zwei Substanzen handelt. Erhöht man die Meßwellenlänge auf 270 nm ( B ), erfolgt die Identifizierung von Phenacetin als der kleinere ( Wegrücken vom Maximum ), bzw. Coffein als der größer werdende Peak ( Maximum erreicht ).

Soll nun z.B. Coffein ausgeblendet werden, wird die Meßwellenlänge auf das Maximum von Phenacetin eingestellt und die Referenz auf den entsprechenden Flankenpunkt. Ortskurve C gibt die Coffeinabsorption noch deutlich als Schulter zu erkennen. Bei der Wellenlängenkombination 250 / 285 nm kann Phenacetin quantitativ bestimmt werden. Entsprechende Vergleiche mit Reinsubstanzen gleicher Konzentration ergeben praktisch keine Abweichungen. Variiert man die Kombination zu 250 / 295 nm, resultiert eine negative Ortskurve für Coffein. Dieser Zusammenhang, bzw. die Änderung des Phenacetinnutzsignals ist in Abb.25 noch einmal zeichnerisch verdeutlicht.

Die Methode der Peakunterdrückung ist auch im Zick-Zack-Scanverfahren zu realisieren. In Verbindung mit der Untergrundkorrektur (BCU - 1), die nach jeder Zick- und Zack-Bewegung eine 100 % -Nachstellung durchführt, können znnächst die Spektren der Einzelsubstanzen direkt auf der Dünnschichtplatte aufgenommen werden. Man geht hierbei so vor, daß man, während sich der Meßquadrant auf einer substanzfreien Zone befindet, die Wellenlänge in diskreten Schritten verstellt ( s. Abb.27, Anlage ). Nach Kenntnis der in Frage kommenden Meß- und Eliminationswellenlänge erfolgt die Optimierung auf der zu unterdrückenden Substanzzone solange, bis die positiven und negativen Signale gleich groß sind. Dies kommt einer quantitativen Ausblendung gleich ( Abb.26 ).

Die Peakunterdrückung nach dem Zweiwellenlängenverfahren erlangt dann eine praktische Bedeutung, wenn es nicht möglich ist, zwei Komponenten einwandfrei zu trennen oder z.B. bei einer nicht abzutrennenden Verunreinigung in einer Hauptkomponente. Im Bereich der Naturstoffanalytik eröffnen sich Möglichkeiten, Substanzen auf von Start bis Front verlaufenden Extraktivstoffen auch quantitativ durch in situ-Messung zu bestimmen. Da hierbei - anders als bei der Kenntnis des Sollwertes - auf Grund naturgegebener Schwankungen Konzentrationsbereiche über Zehnerpotenzen vermessen werden müssen, ist es zweckmäßig, die Linearisierung über die KUBELKA-MUNK-Funktion vorzunehmen. Zur Wandlung der Meßsignale kann der LINEARIZER ( LIN-53 ) eingesetzt werden, der bei entsprechender Datenerfassung auch eine on line-Auswertung mit Kleinrechnern ermöglicht.

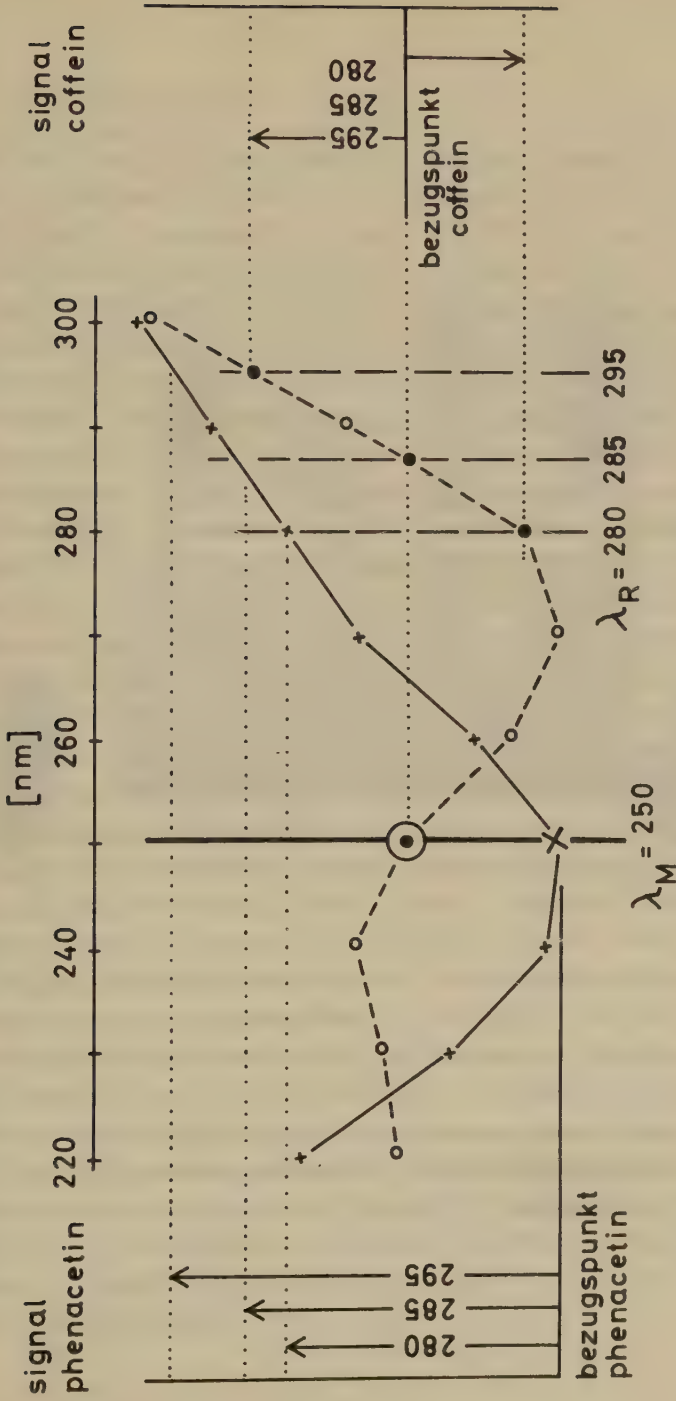


Abb. 25

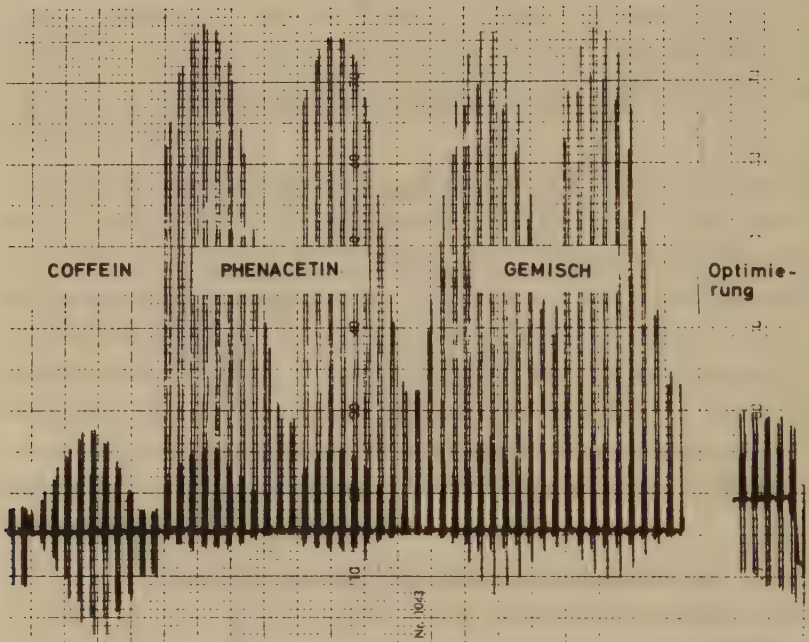


Abb.26: Optimierung der auszublendenden Komponente Coffein.  
Bestimmung von Phenacetin als Reinsubstanz und im Gemisch  
( jeweils zweimal ).

## 12. Schlußbetrachtung

Mit dieser Arbeit wird demonstriert, daß die quantitative Dünnschichtchromatographie weitgehendst automatisierbar ist, sowohl bezüglich der Auswertung, als auch im Hinblick auf den gesteuerten Scanbetrieb. Bei sorgfältiger Beachtung der chromatographischen Parameter werden Meßdaten erzeugt, die ohne aufwendige Glättungen oder Wandlungen und ohne komplizierte Ausgleichsfunktionen von on line-gekoppelten Kleinrechnern direkt verarbeitet werden können. Dabei kommen die verschiedenen densitometrischen Meßprinzipien zum Einsatz. Hier erweisen die Zweistrah- und Zweiwellenlängenverfahren ihre Überlegenheit gegenüber der Einstrahlmethode in der Remissionsanalyse. Die rechnerische Erstellung von Ausgleichsfunktionen und somit die Unabhängigkeit von graphischen Lösungen bringt mehr Präzision, Sicherheit und auch Zeitersparnis. Es wird aufgezeigt, daß - abweichend von der Norm - auch im engen Konzentrationsbereich der Fluoreszenzanalyse eine parabolische Regression in Frage kommen kann. Es erfolgen kritische Stellungnahmen und Korrekturen bezüglich Literaturberichten, wie über den Begriff "Fleckeindringtiefe", zur Zweipunkteichung durch den Koordinatennullpunkt im Bereich der Fluoreszenz und zur Standardzumischmethode. Unter Bestätigung der Nichtübertragbarkeit von Eichfunktionen werden diese im eingeschränkten Konzentrationsbereich umgeformt. Mit der Methode des internen Standards ergeben sich höhere Analysenzahlen pro DC-Platte unter Elimination des Auftragefehlers. Zur Flächenbestimmung der Ortskurven einerseits und zur Digitalisierung der Analogsignale andererseits wird vornehmlich ein Integrator eingesetzt. Es kann jedoch gezeigt werden, daß - zumindest im eingeschränkten Konzentrationsbereich - im Bereich der Remissionsmessung die in der Fluoreszenz übliche Peakhöhenauswertung durch Ausschalten des Integratorfehlers zu besseren Ergebnissen führt. Mehrkomponententablettenanalysen unterstreichen die Bedeutung der quantitativen Auswertung von Dünnschichtplatten bei der Bewältigung der von den GMP-Richtlinien geforderten Einzelproben.

Es eröffnen sich schließlich Möglichkeiten, auch außerhalb des Einsatzes in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle die quantitative DC für den Bereich der Naturstoffanalytik nutzbar zu machen. Bei punktförmiger Auftragechnik und entsprechender Güte der Chromatogramme können sich Linear- und Zick-Zack-Scansystem bisher die Waage halten.

Es bleibt zu untersuchen, inwieweit sich ein Präzisionsgewinn erzielen läßt, wenn durch ein variables Steuersystem die Spaltblende vor jedem Fleck nachpositioniert wird und auf diese Weise die chromatographischen Effekte auf langen Trennstrecken bei Vielkomponentenanalysen Berücksichtigung finden. Ferner müßte das Zick-Zack-Scansystem zunächst bezüglich seiner Auswertung Digitalrechnern zugänglich werden, um den Vorteil des besseren Peakauflösungsvermögens voll nutzbar zu machen. Bereits jetzt kann der automatisierten Densitometrie bei hoher Flexibilität im Vergleich zu anderen analytischen Präzisionsverfahren eine aussichtsreiche Zukunft eingeräumt werden, wie auch das große Interesse von Industrie und Forschung während der Durchführung dieser Arbeit beweist.

ANHANG

Integrator INFOTRONICS CRS 104

mit Remissionszusatz und INFOCALC-Ausgang

prinzipielle Einstellung für Remissionsauswertung ( Fluoreszenz ) :

|                       |   |                   |
|-----------------------|---|-------------------|
| Base line tracking    | : | 600 $\mu$ V / min |
| Threshold level       | : | 200 $\mu$ V / min |
| Count rate            | : | 4 KHz             |
| Input noise rejection | : | 5.7 ( 5.5 )       |
| Slope sensitivity     | : | 2 ( 1 )           |
| Digital filtering     | : | 500 ( 2000 )      |

Auftragesysteme

1. 1  $\mu$ l UNIMETRICS-Präzisionsspritze  
90° abgeschliffene Nadel  
0.4  $\mu$ l Auftragemenge für Einzeldosierung  
MACHEREY und NAGEL
2. 0.5  $\mu$ l MICROCAPS  
Sonderanfertigungsgröße  
DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY, U.S.A.  
SHANDON Labortechnik, Frankfurt/Main

## Densitometer

### 1. DC - Spektralphotometer ZEISS

Meßanordnungen: M / Pr ; Pr / M ; simultan

Hg-Lampe St 41 ; Sperrfilter FL 39 ; Meßkopfhöhe:

2 mm über der Dünnschichtplatte.

### 2. DC - Fluorimeter MPF 3 A PERKIN ELMER

Impedanzwandler zwischen Densitometer und

INFOTRONICS-Integrator schalten.

### 3. SCHOEFFEL SD 3000 Densitometer

Spannungsteiler 1 : 10 zwischen Densitometer

und INFOTRONICS-Integrator schalten ;

PHILIPS PM 8000 oder SERVOGOR als schnelle

Schreiber zur Fleckpositionierung verwenden ;

Monochromatoreintrittsspalt: 2 mm.

### 4. SHIMADZU CS 900 Scanner

in Verbindung mit Backgroundcorrection ( BCU - 1 ) und

Calibration Curve Linerizer ( LIN - 53 ) ;

mit COLORA 1200 - Zweikanalschreiber, da bisher keine  
on line-Auswertung möglich.

## DIEHL COMBITRON S

100 - Speicherplatz-Tischrechner mit Dilector zum Einlesen von Achtkanal-lochstreifen, die in der Zentralen Rechenanlage Marburg erstellt wurden. Das über den Integrator analog/digital gewandelte Signal kann über den INFOCALC-Ausgang des INFOTRONICS-Integrators ohne weitere Anpassung direkt dem Dilector zugeführt werden.

## DC-Platten

DC-Fertigplatten Kieselgel 60, MERCK, Darmstadt, Art. 5721, bei Verwendung von F-Platten: Art. 5715.

Im allgemeinen werden acht Auftragungen im Abstand von 2 cm untereinander und 2 cm vom Plattenrand vorgenommen. Wegen des Vergleichsspalt es beim SCHOEFFEL SD 3000 - Densitometer beträgt hier der Abstand der Einzelauftragungen 2.3 cm. Die Startlinie liegt für alle Chromatogramme 2 cm vom unteren Plattenrand entfernt.

## Tischvorschub

Die experimentell ermittelte, optimale Vorschubgeschwindigkeit in Verbindung mit dem INFOTRONICS-Integrator bewegt sich zwischen 30 und 50 mm pro Minute, im einzelnen:

- |    |                    |     |           |
|----|--------------------|-----|-----------|
| a) | ZEISS Densitometer | :   | 30 mm/min |
| b) | MPF 3 A            | " : | "langsam" |
| c) | SCHOEFFEL          | " : | 50 mm/min |

## Substanzen

|                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| Chinin reinst       | C.H. BOEHRINGER & Sohn, Ingelheim |
| Phthalsäure p.a.    | MERCK, Darmstadt                  |
| Thiabendazol        | SHARP und DOHME GmbH., München    |
| Coffein rein        | MERCK, Darmstadt                  |
| Phenacetin crist.   | MERCK, "                          |
| Salicylsäure p.a.   | MERCK, "                          |
| Sudan III           | MERCK, "                          |
| Aminophenazon       | ALDRICHE Europe                   |
| Phenazon            | ALDRICHE Europe                   |
| PHB-Äthylester      | RIEDEL DE HAEN, Seelze Hannover   |
| -Propylester        | RIEDEL DE HAEN, "                 |
| Anthranilsäure p.a. | RIEDEL DE HAEN, "                 |
| Acetylsalicylsäure  | BAYER AG., Leverkusen             |

## Tabletten

|                                             |                                                            |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Coffein Compretten 0.2 ( Coffein x $H_2O$ ) | MBK, Herst. F. MERCK                                       |
| Cafaspin,                                   | BAYER, Leverkusen, Charge: Pt 213071 ( Sonderanfertigung ) |
| Aspirin,                                    | BAYER, Leverkusen, Charge: 6096 K                          |
| Thomapyrin,                                 | THOMAE, Biberach, Charge: 3146                             |
| Thomapyrin N,                               | THOMAE, Biberach, Charge: 4013                             |
| Pyramidon 0.3,                              | HOECHST, Frankfurt/M., Charge: L 115                       |

Tabelle 23: Reproduzierbarkeit des Integrators INFOTRONICS CRS 104  
( Integratorcounts ) am Beispiel der fluorimetrischen Bestimmung von 200 ng Salicylsäure.

|       |       |                                      |
|-------|-------|--------------------------------------|
| 19962 | 19641 |                                      |
| 19871 | 19662 |                                      |
| 19753 | 19781 |                                      |
| 19796 | 19714 | $\bar{x} :$ 19708                    |
| 19645 | 19671 | $\sigma_{\text{rel}} (n=20) :$ 0.454 |
| 19680 | 19658 |                                      |
| 19665 | 19599 |                                      |
| 19643 | 19647 |                                      |
| 19653 | 19646 |                                      |
| 19713 | 19753 |                                      |

Tabelle 24: Reproduzierbarkeit der 1  $\mu\text{l}$  - Präzisionspritze UNIMETRICS;  
aufgetragene Menge: 0.4  $\mu\text{l}$  = 20 ng Chinin ( Integratorcounts ),  
acht Auftragungen pro DC-Platte.

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| 77921 |                                    |
| 77579 |                                    |
| 78500 |                                    |
| 78579 | $\bar{x} :$ 77557                  |
| 76524 | $\sigma_{\text{rel}} (n=8) :$ 1.06 |
| 78379 |                                    |
| 77019 |                                    |
| 76956 |                                    |

Tabelle 25: Reproduzierbarkeit der 0.5 µl - Mikrokapillare MICROCAPS;  
Remissionsmessung an 1 µg Phthalsäure ( Integratorcounts);  
acht Auftragungen pro Platte.

|       |                               |       |
|-------|-------------------------------|-------|
| 15009 |                               |       |
| 14851 |                               |       |
| 14932 | $\bar{x}$ :                   | 14989 |
| 15037 |                               |       |
| 15121 | $\sigma_{\text{rel}} (n=8)$ : | 0.817 |
| 15191 |                               |       |
| 14880 |                               |       |
| 14889 |                               |       |

Tabelle 26: Reproduzierbarkeit von Thiabendazol ( s.Kap. 2.3.) im Bereich  
von 2 - 8 und 10 - 40 Nanogramm; Auswertung von jeweils vier  
Platten; Meßwertausgleich über Polynom 2.Grades.

| vorgegeben | gefunden | vorgegeben | gefunden |
|------------|----------|------------|----------|
| 2          | 1.992    | 10         | 9.73     |
|            | 1.994    |            | 10.15    |
|            | 2.020    |            | 10.02    |
|            | 2.120    |            | 10.12    |
| 4          | 4.260    | 20         | 20.02    |
|            | 4.320    |            | 20.24    |
|            | 3.920    |            | 19.66    |
|            | 3.560    |            | 20.74    |
| 6          | 5.718    | 30         | 30.42    |
|            | 5.658    |            | 29.16    |
|            | 6.078    |            | 30.03    |
|            | 6.240    |            | 27.79    |
| 8          | 8.080    | 40         | 40.52    |
|            | 7.960    |            | 42.08    |
|            | 7.660    |            | 39.32    |
|            | 8.080    |            | 39.60    |

$\bar{x}$  : 99.63

$\sigma_{\text{rel}} (n=16)$  : 5.08

$\bar{x}$  : 100.33

$\sigma_{\text{rel}} (n=16)$  : 2.16

# Substanzen, Konzentrationen, Lösungen

| Kapitel | Substanz                                               | Lösung<br>mg / ml                                | Tablette<br>pro ml | Lösungs-<br>mittel                              | Auftrage-<br>menge $\mu\text{g}$   |
|---------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|
|         | Chinin                                                 | 10-40<br>/ 100<br>1 / 4<br>weiter ver-<br>dünnen |                    | Methanol                                        | 0.01 -<br>0.04                     |
|         | Phthalsäure                                            | 100 -<br>250<br>/ 25                             |                    | Äthanol                                         | 2-5                                |
|         | Thiaben-<br>dazol                                      | 10 -<br>40<br>/ 100                              |                    | Äthanol                                         | 0.05 -<br>0.2                      |
|         | Coffein /<br>Phenacetin                                | 50 $\pm 10\%$<br>200<br>/ 100                    |                    | Chloroform<br>Äthanol<br>5 : 95 v/v             | 0.25 $\pm 10\%$<br>1.0             |
|         | Aspirin /<br>Phenacetin /<br>Coffein /<br>Salicylsäure | 250 $\pm 10\%$<br>200<br>50<br>10-40<br>/ 100    | 1/50               | Chloroform<br>Äthanol<br>10 : 40 v/v<br>Äthanol | 2.5<br>2.0<br>0.5<br>0.05 -<br>0.2 |
|         | Coffein /<br>Phenacetin                                | 320<br>400<br>/ 100                              | 1/50               | s.o.                                            | 1.6<br>2.0                         |
|         | Aspirin /<br>Anthranils.                               | 50<br>50<br>/ 100                                | 1/250<br>1/4       | Äthanol                                         | 0.25                               |

| Kapitel | Substanz    | Lösung<br>mg/ml | Tablette<br>pro ml | Lösungs-<br>mittel | Auftrage-<br>menge $\mu\text{g}$ |
|---------|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|
|         | Aspirin     | 50              | 1/100              | Äthanol            | 2.5                              |
|         | Coffein     | 200             |                    |                    | 0.25                             |
|         | Phenacetin  | 500             |                    |                    | 1.0                              |
|         |             | /100            |                    |                    |                                  |
|         | Aspirin     | 250             | 1/50               | s.o.               | 2.5                              |
|         | Paracetam.  | 200             |                    |                    | 2.0                              |
|         | Coffein     | 50              |                    |                    | 0.5                              |
|         | PHB-Ester   | 100             |                    |                    | 1.0                              |
|         |             | / 50            |                    |                    |                                  |
|         | Phenacetin  | 150             |                    | Chloroform         | 1.5                              |
|         | Am. phenaz. | 150             |                    | Äthanol            | 1.5                              |
|         | Coffein     | 50              |                    | 10:40              | 0.5                              |
|         | Phenacetin  | 150             |                    |                    | 1.5                              |
|         | PHB-Ester   | 100             |                    |                    | 1.0                              |
|         |             | / 50            |                    |                    |                                  |
|         | Am. phenaz. | 300             | 1/100              | Äthanol            | 1.5                              |
|         | Phenazon    | 300             |                    |                    | 1.5                              |
|         |             | / 100           |                    |                    |                                  |
|         | Sudanrot    | 100             |                    | Äthanol            | 0.5                              |
|         |             | / 100           |                    |                    |                                  |

# Chromatographische Parameter

Fließmittel haben p.a. Qualität, soweit möglich. Die Entwicklung erfolgt in bei 20° thermostatisierten N-Kammern, aufsteigend, jeweils nur eine Platte.

| Substanzen                 | Lösungen              | Teile<br>v/v | Laufstrecke<br>Start - Front<br>( cm ) | Rf   | gesättigt |
|----------------------------|-----------------------|--------------|----------------------------------------|------|-----------|
| Chinin                     | Benzol                | 20           | 8                                      | 0.41 | nein      |
|                            | Äther                 | 20           |                                        |      |           |
|                            | Dichlor-<br>methan    | 29<br>8      |                                        |      |           |
|                            | Diäthyl-<br>amin      | ( 36 )       |                                        |      |           |
| Phthalsäure                | Diisopropyl-<br>äther | 90           | 8                                      | 0.52 | nein      |
|                            | Ameisensäure          | 7            |                                        |      |           |
|                            | Wasser                | 3<br>( 45 )  |                                        |      |           |
| Thiabendazol               | Benzol                | 50           | 10                                     | 0.34 | nein      |
|                            | Aceton                | 5            |                                        |      |           |
|                            | Eisessig              | 20           |                                        |      |           |
|                            | Wasser                | 2<br>( 50 )  |                                        |      |           |
| Coffein                    | n-Hexan               | 45           | 14.5                                   | 0.21 | ja        |
| Phenacetin                 | Dioxan                | 40           |                                        | 0.35 |           |
| Aspirin                    | Ameisensäure          | 2            |                                        | 0.49 |           |
| Sorbinsäure                |                       |              |                                        | 0.60 |           |
| Coffein                    | Aceton                | 30           | 14                                     | 0.28 | ja        |
| Paracetam.                 | Chloroform            | 30           |                                        | 0.40 |           |
| Aspirin                    | Ameisensäure          | 1            |                                        | 0.52 |           |
| PHB-Ester<br>( Nipagin A ) |                       |              |                                        | 0.62 |           |

| Substanzen                    | Lösungen                  | Teile<br>v/v | Laufstrecke<br>( cm ) | Rf   | gesättigt |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|-----------------------|------|-----------|
| Salicylsäure                  | n-Hexan                   | 30           | 10                    | 0.44 | ja        |
|                               | Essigsäure-<br>äthylester | 20<br>2      |                       |      |           |
|                               | Ameisensr.                |              |                       |      |           |
| Aspirin                       | Benzol                    | 60           |                       | 0.81 | nein      |
| Anthranil-<br>säure           | Dioxan                    | 20           |                       | 0.68 |           |
|                               | Eisessig                  | 2            |                       |      |           |
| Phenacetin                    | Aceton                    | 40           | 15                    | 0.48 | ja        |
| Am. phenaz.                   | Tetra                     | 30           |                       | 0.63 |           |
| Coffein                       | Chloroform                | 20           |                       | 0.28 |           |
| Phenazon                      | Dioxan *                  | 10           |                       | 0.19 |           |
| PHB-Ester                     |                           |              |                       | 0.64 |           |
| Sudan III<br>( Sudanrot )     | Chloroform                | 60           | 12                    | 0.67 | ja        |
|                               | Aceton                    | 5            |                       |      |           |
| Am. phenaz.                   | Chloroform                | 40           | 10                    | 0.40 | ja        |
|                               | Aceton                    | 10           |                       | 0.22 |           |
| Coffein                       | Aceton                    | 50           | 10                    | 0.45 | ja        |
|                               | Chloroform                | 10           |                       |      |           |
| für<br>Peakunter-<br>drückung | Chloroform                | 50           | 10                    | 0.38 | ja        |
| Coff./Phenac.                 | Ameisensäure              | 2            |                       |      |           |

\* p. a. Dioxan von BAYER nach zweimaliger Destillation mit NORMATRON-68-System, Rücklaufverhältnis 10 : 1

# Densitometerdaten

| Substanz                | Meßwellenlänge (nm) | Lichtquelle | Spalt mm | Densitometer  |
|-------------------------|---------------------|-------------|----------|---------------|
| Chinin *                | 365 Exz.            | Hg          | 3.5 x 2  | ZEISS         |
|                         | 460 Em.             |             |          | Pr/M          |
| Phthalsäure             | 280.3               | Hg          | 6 x 0.5  | ZEISS<br>M/Pr |
| Thiabendazol            | 313 Exz.            | Hg          | 8 x 2    | ZEISS         |
|                         | F1 39               |             |          | M/Pr          |
|                         | 310 Exz.            | Xe          | 8 x 1    | MPF 3 A       |
|                         | 355 Em.             |             |          | PERKIN-ELMER  |
| Coffein /<br>Phenacetin | 275                 | Hg / Xe     | 7 x 0.5  | SCHOEFFEL     |
| Salicylsäure            | 313 Exz.            | Hg          | 10 x 1.5 | ZEISS         |
|                         | F1 39               |             |          | M/Pr          |
|                         | 290 Exz.            | Hg / Xe     |          | SCHOEFFEL     |
|                         | 420 Em.             |             |          |               |
|                         | 290 Meß.            | De          |          | SHIMADZU      |
|                         | 390 Vergl.          |             |          |               |

\* Zur Fluoreszenzverstärkung werden die DC-Platten nach der Entwicklung kurz in Äther / konz. Schwefelsäure ( 95 : 5 v/v ) getaucht.

| Substanz                                                   | Meßwellen-<br>länge nm | Lichtquelle | Spalt<br>mm                       | Densitometer                        |
|------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Aspirin /<br>Anthranil-<br>säure                           | 300 Exz.               | Hg / Xe     | 10 x 0.5                          | SCHOEFFEL<br>Interferenz-<br>filter |
| Coffein /<br>Paracetam. /<br>Aspirin /<br>PHB-Ester        | 275                    | Hg / Xe     | 10 x 0.5                          | SCHOEFFEL                           |
| Phenacetin<br>Am.phenaz.<br>Coff. / Phenaz. /<br>PHB-Ester | 275                    | Hg / Xe     | 10 x 0.5                          | SCHOEFFEL                           |
| Am.phenaz. /<br>Phenazon                                   | 165.2                  | Hg          | 3.5 x 2<br>Segment-<br>ausschnitt | ZEISS mit<br>Analogsteuerung        |
| Sudan III                                                  | 500                    | Gl          | 10 x 1                            | ZEISS                               |
|                                                            |                        | Hg / Xe     | 10 x 0.5                          | SCHOEFFEL                           |
|                                                            | / 600 Ref.             | De          | 10 x 1                            | SHIMADZU                            |
| Coffein                                                    | 254                    | De          | 6 x 0.5                           | SHIMADZU<br>Fl.-Quench.             |

Tabelle 27: Einzelergebnisse - Methode

| Interner Standard       |            |         | Drei Eichgeraden        |            |         |
|-------------------------|------------|---------|-------------------------|------------|---------|
| Acetylsalicyl-<br>säure | Paracetam. | Coffein | Acetylsalicyl-<br>säure | Paracetam. | Coffein |
| 101.1                   | 98.1       | 95.1    | 101.2                   | 99.3       | 102.9   |
| 95.0                    | 97.4       | 98.4    | 100.6                   | 103.0      | 103.8   |
| 96.1                    | 100.1      | 101.2   | 98.3                    | 100.7      | 100.9   |
| 97.6                    | 93.7       | 97.0    | 102.4                   | 100.8      | 100.5   |
| 100.7                   | 98.4       | 98.4    | 100.6                   | 100.9      | 101.3   |
| 100.1                   | 95.9       | 104.4   | 100.7                   | 102.2      | 101.3   |
| 99.3                    | 97.3       | 98.8    | 99.7                    | 98.7       | 105.1   |
| 98.5                    | 97.1       | 100.4   | 100.9                   | 100.2      | 103.8   |
| 97.1                    | 101.1      | 103.2   | 96.3                    | 102.5      | 99.5    |
| 100.4                   | 97.7       | 98.0    | 99.4                    | 101.0      | 99.3    |
| 98.8                    | 95.3       | 96.7    | 101.7                   | 101.7      | 100.8   |
| 99.1                    | 98.6       | 98.9    | 101.5                   | 102.4      | 96.8    |
| 102.2                   | 97.2       | 96.6    | 104.9                   | 96.3       | 95.8    |
| 100.2                   | 101.2      | 101.0   | 101.0                   | 97.6       | 104.0   |
| 101.3                   | 99.9       | 104.3   | 95.6                    | 100.9      | 102.9   |
| 100.8                   | 96.7       | 104.4   | 97.9                    | 101.2      | 99.1    |

$\bar{x}$ : 99.27     $\bar{x}$ : 97.86     $\bar{x}$ : 99.8     $\bar{x}$ : 100.17     $\bar{x}$ : 100.59     $\bar{x}$ : 101.11

$\sigma_{\text{rel}}$ : 2.01     $\sigma_{\text{rel}}$ : 2.08     $\sigma_{\text{rel}}$ : 3.02     $\sigma_{\text{rel}}$ : 2.30     $\sigma_{\text{rel}}$ : 1.81     $\sigma_{\text{rel}}$ : 2.58

Tabelle 28:

Ergebnisse, Mittelwerte in % und genäherte relative Standardabweichungen mit variablem internen Standard ( Fleck \* ) über zehn Platten mit je acht Bahnen.

1) Fichbahn, Analysenbahn alternierend ( Abb.15 ) ( EA ):

| Fleck | Substanz        | Fleck  |        |        |       |        |
|-------|-----------------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |                 | 1      | 2      | 3      | 4     | 5      |
| 1     | PHB-Propylester |        | 100.31 | 100.06 | 99.70 | 99.96  |
|       |                 | *      | 2.761  | 3.019  | 3.167 | 3.787  |
| 2     | Phenacetin      | 99.75  | *      | 99.77  | 99.40 | 99.66  |
|       |                 | 2.722  |        | 2.508  | 2.373 | 3.318  |
| 3     | Aminophenazon   | 100.02 | 100.29 | *      | 99.65 | 99.89  |
|       |                 | 3.033  | 2.508  |        | 1.756 | 1.989  |
| 4     | Coffein         | 100.39 | 100.65 | 100.37 | *     | 100.25 |
|       |                 | 3.186  | 2.388  | 1.857  |       | 2.284  |
| 5     | Phenazon        | 100.17 | 100.44 | 100.14 | 99.78 | *      |
|       |                 | 3.876  | 3.361  | 2.011  | 2.201 |        |

2) Eichbahn, gefolgt von drei Analysenbahnen ( EAAA ):

| Fleck | Substanz             | Fleck  |        |        |       |        |
|-------|----------------------|--------|--------|--------|-------|--------|
|       |                      | 1      | 2      | 3      | 4     | 5      |
| 1     | PHB-Propyl-<br>ester | *      | 100.66 | 100.04 | 98.77 | 99.50  |
|       |                      |        | 2.422  | 3.690  | 4.356 | 4.133  |
| 2     | Phenacetin           | 99.39  |        | 99.38  | 98.11 | 98.86  |
|       |                      | 2.375  | *      | 3.077  | 3.487 | 3.841  |
| 3     | Amino-<br>phenazon   | 100.08 | 100.70 |        | 98.74 | 99.48  |
|       |                      | 3.735  | 3.074  | *      | 2.957 | 2.829  |
| 4     | Coffein              | 101.42 | 102.04 | 101.35 |       | 100.78 |
|       |                      | 4.391  | 3.497  | 3.052  | *     |        |
| 5     | Phenazon             | 100.66 | 101.29 | 100.59 | 99.28 |        |
|       |                      | 4.100  | 3.768  | 2.809  | 2.654 | *      |

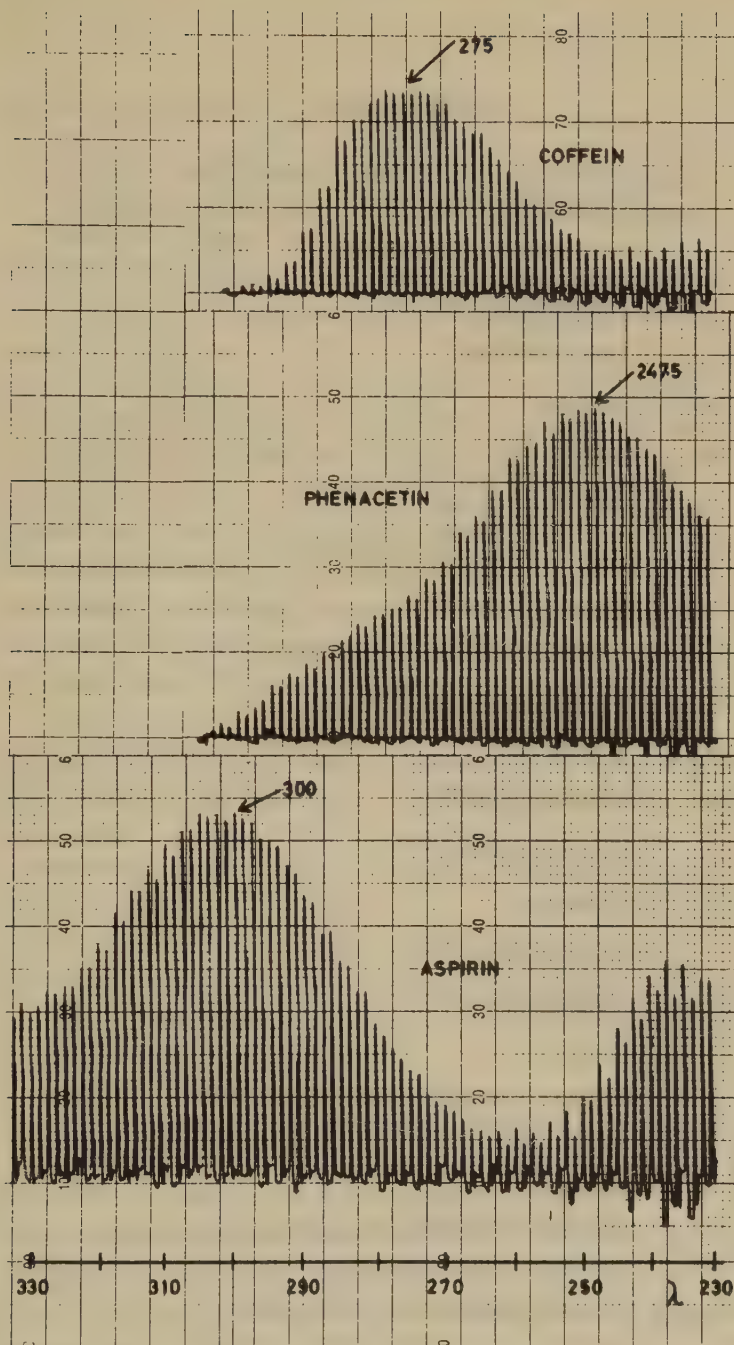


Abb.27: Spektrenaufnahme im Zick-Zack-Scanbetrieb.

Zeichenerklärungen

|                                                                                     |                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| c                                                                                   | Konzentration im DC-Fleck                                                              |
| F                                                                                   | Fläche unter der Ortskurve                                                             |
| n                                                                                   | Zahl der Eichbahnen                                                                    |
| St                                                                                  | interner Standard                                                                      |
| Eich                                                                                | Eichbahn                                                                               |
| Anal                                                                                | Analysenbahn                                                                           |
| i                                                                                   | Index für Eichfleck                                                                    |
| x                                                                                   | Index für zu bestimmende Substanz                                                      |
| B                                                                                   | Index für Bezugsfleck                                                                  |
| N                                                                                   | Index für "scheinbare Nachweisgrenze"                                                  |
| P                                                                                   | Programmspeicher                                                                       |
| LS                                                                                  | Lochstreifen                                                                           |
| De                                                                                  | Deuteriumlampe                                                                         |
| Hg                                                                                  | Quecksilberlampe                                                                       |
| Gl                                                                                  | Glühlampe                                                                              |
| Xe                                                                                  | Xenonhochdrucklampe                                                                    |
| M                                                                                   | Monochromator                                                                          |
| Pr                                                                                  | Probe                                                                                  |
| FA                                                                                  | Eichbahn / Analysenbahn alternierend<br>entsprechend: EAAA , EAAA<br>oder: AAAE , AAAA |
|  | Symbol für Abarbeiten des entsprechenden Programmspeichers ( oder LS-Steuerung )       |
| R <sub>abs</sub>                                                                    | absolute Remission des Untergrundes                                                    |

## Literaturverzeichnis

- 1) K.G.KREBS, D.HEUSSER und H.WIMMER in E.STAHL, Dünnschicht-chromatographie, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967), S. 813
- 2) J.C.TOUCHSTONE, Quantitative Thin-Layer Chromatography, Verlag: John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto (1973), S.57
- 2a) " S.213
- 3) H.W.SCHMIDT und H.NEUKOM, Helv.Chim.Acta, 49, 510 (1966)
- 4) M.L.BLANK, J.A.SCHMIT und O.S.PRIVETT, J.Am.Oil Chem.Soc., 41, 371 (1964), ( zit. nach 10 )
- 5) S.EBEL und P.POST, unveröffentlichte Ergebnisse
- 6) W.MESSERSCHMIDT, Dtsch. Apoth. Ztg., 111, 597 (1971)
- 7) H.GÄNSHIRT und K.MORIANZ, Arch.Pharmaz., 293, 1065 (1960)
- 8) H.BÖHME und R.BITSCH, Arch.Pharmaz., 303, 418 (1970)
- 9) H.OELSCHLÄGER, K.BUNGE, G.T.LIM und G.KRAFT, Arch.Pharmaz., 307, 796 (1974)
- 10) S.EBEL, H.HOLTZ und H.LERCHE, Dtsch.Apoth. Ztg., 108, 779 (1968)
- 11) J.G.KIRCHNER, J.M.MILLER und G.J.KELLER, Anal.Chem., 23, 420 (1951)
- 12) T.KARTNING, A.HIERMANN und G.MIKULA, Pharm.Zentralh., 108, 177 (1969)
- 13) E.BAHR, S.EBEL und F.PLATE, J.Chromatog. 59, 212 (1971)
- 14) R.W.FREI in A.NIEDERWIESER und G.PATAKI: Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Ann Arbor-Humphry Science Publ., Ann Arbor 1970
- 15) W.TAUSCH, Meßtechnik, 80, 38 (1972)
- 16) E.J.SHELLARD, Symposiumsber.: Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, Academic Press, New York 1968
- 17) N.SEILER und H.MÖLLER, Chromatographia, 2, 273 (1969)
- 18) N.SEILER und H.MÖLLER, Chromatographia, 2, 319 (1969)
- 19) N.SEILER und H.MÖLLER, Chromatographia, 2, 470 (1969)
- 20) S.J.PURDY und E.V.TRUTER, Chem. and Industr. (London), 506 (1962)
- 20a) Analyst, 87, 802 (1962)

- 21) S.FBEL, W.D.MIKULLA und K.H.WEISEL, Dtsch.Apoth.Ztg., 111,  
931 (1971)
- 22) U.HEZEL, Angew.Chem., 85, 334 (1973)
- 23) R.KLAUS, J.Chromatog., 62, 99 (1971)
- 24) H.JORK, Z.Anal.Chem., 236, 310 (1968)
- 25) H.JORK, J.Chromatog., 82, 85 (1973)
- 26) H.KUSSMAUL, Dissertation, Marburg (1972)
- 27) K.SHIBATA, Biochim. et Biophys. Acta, 304, 249 (1973)
- 28) S.FBEL und H.KUSSMAUL, Z.Anal.Chem., 269, 10 (1974)
- 29) H.YAMAMOTO, T.KURITA, J.SUZUKI, R.HIRA und H.MAKABE,  
Shimadzu Scient.Instr.News, Nr.6 (1974)
- 30) H.JORK, J.Chromatog., 48, 372 (1970)
- 31) E.RÖDER, Mitt.Dtsch.Pharm.Ges., 40, 176 (1970)
- 32) F.GEISS, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie,  
Verlag Vieweg & Sohn, Braunschweig (1972), S.240
- 33) H.HALPAAP, J.Chromatog., 78, 77 (1973)
- 34) J.HOCKE, Dissertation, Marburg (in Vorbereitung)
- 35) S.FBEL und G.HEROLD, Z.Anal.Chem., 266, 281 (1973)
- 36) K.RÖDER, E.EICH und E.MUTSCHLER, Pharmaz.Ztg., 115, 1430 (1970)
- 37) S.FBEL und G.HEROLD, Deut.Lebensmittel Rsch., 67, 301 (1971)
- 39) R.BITSCH, Dissertation, Marburg (1968)
- 40) P.KUBELKA und F.MUNK, Z.Techn.Physik, 12, 593 (1931)
- 41) H.JORK und E.STAHL, Zeiss-Informationen, 16, 52 (1968)
- 42) G.KYNAST, Z.Anal.Chem., 256, 20 (1971)
- 43) ZFISS, Unterlagen zum Chromatogramm-Spektralphotometer
- 44) S.FBEL und H.KUSSMAUL, Chromatographia, 7, 197 (1974)
- 45) E.KNAPPE und I.ROHDEWALD, Z.Anal.Chem., 210, 183 (1965)
- 46) S.FBEL und G.HEROLD, Z.Anal.Chem., 270, 19 (1974)
- 47) S.FBEL und G.HEROLD, Dtsch.Lebensmittel-Rdsch., 70, 133 (1974)
- 48) F.KRÖLLER, Dtsch.Lebensmittel-Rdsch., 65, 85 (1969)
- 49) 7. VO zur Änderung der Fruchtbehandlungs-VO vom 28.3.1972 (BGBl.I S.523)
- 50) H.HFY, Z.Lebensm.Unters.-Forsch., 149, 79 (1972)
- 51) H.OTTENEDER, Mitteilungsbl. GDCh Lebensmittelchem. und  
Gerichtl.Chem., 26, 233 (1972)

- 52) S.EBEL und G.HEROLD, Dtsch.Lebensmittel-Rdsch., 67, 301 (1971)
- 53) S.EBEL und G.HEROLD, Z.Anal.Chem., 273, 7 (1975)
- 54) W.GRIMM, J.Chromatog., 89, 39 (1974)
- 55) USP XVIII p. 930
- 56) S.EBEL und G.HEROLD, Arch.Pharmaz. (im Druck )
- 57) R.KLAUS, J.Chromatog., 40, 235 (1969)
- 58) S.EBEL und G.HEROLD, Chromatographia (im Druck )
- 59) R.KAISER, Chromatographie in der Gasphase, Bd.IV; Mannheim:  
Bibliogr.Inst. 1972
- 60) S.EBEL und G.HEROLD, Arch.Pharmaz. (im Druck )
- 61) I.SUNSHINE, Handbook of Analytical Toxicology; Cleveland: Chemical  
Rubber
- 62) S.EBEL und G.HEROLD, Chromatographia (im Druck )
- 63) R.KLAUS, J.Chromatog., 16, 327 (1964)
- 64) S.EBEL und G.HEROLD, Chromatographia (im Druck )
- 65) S.EBEL und G.HEROLD, Veröffentlichung in Vorbereitung.

### Lebenslauf

Am 11.2.1944 wurde ich als Sohn des Stadtchemikers Dr. Gerhard Herold und seiner Ehefrau Ruth, geb. Zäpke, in Frankfurt/Oder geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Frankfurt, Bremen und Beckum/Münster von 1950 bis 1954 wechselte ich auf die Wilhelmschule, Gymnasium für Jungen, in Kassel über. Ich legte dort 1963 die Reifeprüfung ab. Es folgte eine zweijährige Militärzeit mit der Ausbildung zum Leutnant der Reserve.

Meine pharmazeutische Ausbildung begann ich als Praktikant in der Weißenstein-Apotheke und Kreuz-Apotheke in Kassel, wo ich 1967 das Vorexamen bestand. Es folgte das Studium an der Philipps-Universität in Marburg mit der Pharmazeutischen Staatsprüfung 1970. Nach der Teilnahme am Fortgeschrittenen-Praktikum wechselte ich für ein Jahr als Praktikant der Lebensmittelchemie an das Staatliche Chemische Untersuchungsamt in Gießen über. Zurück in Marburg, legte ich 1972 die Lebensmittelchemiker-Hauptprüfung ab. Ich heiratete die Französin Monique Schleicher. Seit 1.11.1971 bin ich am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie als wissenschaftliche Hilfskraft, seit 1.8.1972 als wissenschaftlicher Angestellter, seit Juli 1972 als Doktorand bei Prof.Dr. S.Ebel tätig. Am 26.11.1972 wurde meine Tochter Isabelle geboren.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Böhme, Büsing, Dimroth, Ebel, Führer, Haake, Hartke, Kating, List, Nöth, Nultsch, Schmid, Schmitz, Seitz, Siess, Stamm, Stuke, Unterhalt, Walcher, Wichtl und Willuhn.







